



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

# **KARAKTERISASI MOLEKULER BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL) PENGHASIL BAKTERIOSIN DENGAN GEN 16S rRNA DARI FERMENTASI KAKAO VARIETAS HIBRID (TRINITARIO) DI SUMATERA BARAT**

## **TESIS**



**SITI SARAH YUSDI  
0921207015**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG 2011**

**KARAKTERISASI MOLEKULER BAKTERI ASAM LAKTAT  
(BAL) PENGHASIL BAKTERIOSIN DENGAN GEN 16S rRNA DARI  
FERMENTASI KAKAO VARIETAS HIBRID (*TRINITARIO*)  
DI SUMATERA BARAT**

**SITI SARAH YUSDI**

(Di bawah bimbingan Prof. Dr. Sumaryati Syukur, M.Sc dan  
Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Jamsari, MP)

**RINGKASAN**

Kakao (*Theobroma cacao*) merupakan tanaman komoditas ekspor Indonesia salah satunya adalah kakao hybrid (*Trinitario*) yang merupakan kako hasil persilangan biji hijau (*Criollo*) dan biji merah (*Forestro*). Kakao hibrid memiliki keunggulan dibandingkan dengan kakao jenis yang lain, karena kadar lemak yang rendah, buah dan bijinya berkualitas baik dan toleran terhadap penyakit busuk buah. Biji kakao diselimuti oleh *pulp* yang merupakan jaringan halus berlendir. *Pulp* mengandung air dan gula yang berguna untuk pertumbuhan mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi. Proses Fermentasi menghasilkan mikroorganisme salah satunya adalah Bakteri Asam Laktat (BAL). BAL merupakan bakteri pembentuk asam laktat dalam metabolisme karbohidrat dan terdiri dari berbagai macam bakteri gram positif. BAL dikenal sebagai *Food Grade Microorganism* atau dikenal sebagai mikroorganisme *Generally Recognized As Safe* (GRAS),

yaitu mikroorganisme yang tidak beresiko terhadap kesehatan bahkan berguna bagi kesehatan.

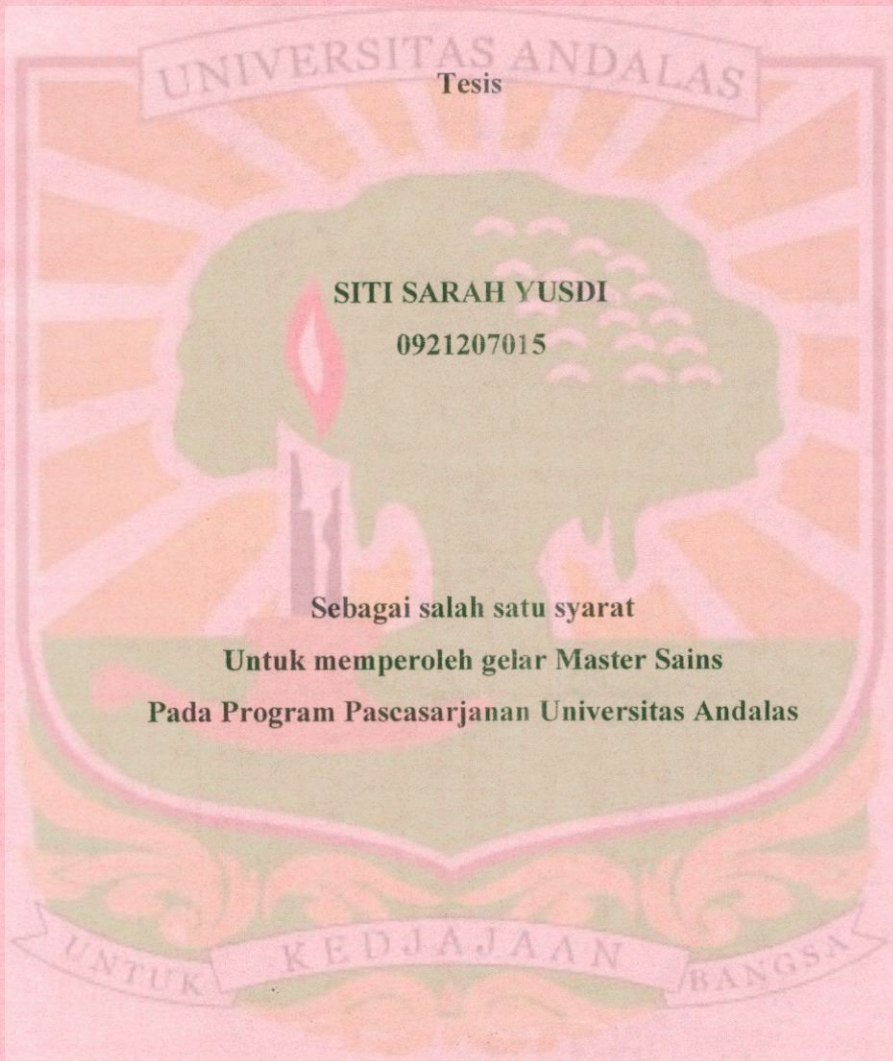
Salah satu senyawa yang dihasilkan oleh BAL adalah bakteriosin yang merupakan senyawa protein yang diekskresikan oleh bakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Bakteriosin dapat digunakan sebagai antibiotik alami, karena memiliki kemampuan sebagai antibakteri yang dapat menghancurkan sel-sel bakteri tersebut sehingga perkembangannya terganggu.

Melihat kemampuan bakteriosin menghambat pertumbuhan bakteri patogen maka perlu dilakukan isolasi bakteriosin dan mengkarakterisasi BAL penghasil bakteriosin secara molekuler serta menguji aktifitas antimikroba dari bakteriosin terhadap bakteri patogen (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *Pseudomonas sp*. dan *Eschericia coli*). Metoda yang digunakan yaitu, isolasi menggunakan medium MRS agar dan identifikasi BAL secara makroskopi dan mikroskopi, uji antimikroba, uji optimasi pembentukan bakteriosin, isolasi dan penentuan berat molekul bakteriosin serta isolasi DNA dengan teknik PCR dan amplifikasi gen 16S rRNA.

Peneletian yang dilakukan mendapatkan 8 isolat BAL, yaitu H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 dan H8 dengan total koloni  $5 \times 10^9$ ,  $33 \times 10^9$ ,  $20 \times 10^9$ ,  $62 \times 10^9$ ,  $68 \times 10^9$ ,  $21 \times 10^9$ ,  $45 \times 10^9$ ,  $32 \times 10^9$ . Memiliki ciri cocus, bewarna putih, tepi koloni licin, mengkilat, sedikit cembung dan dari



**KARAKTERISASI MOLEKULER BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL)  
PENGHASIL BAKTERIOSIN DENGAN GEN 16S rRNA DARI  
FERMENTASI KAKAO VARIETAS HIBRID (*TRINITARIO*)  
DI SUMATERA BARAT**



**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG  
2011**



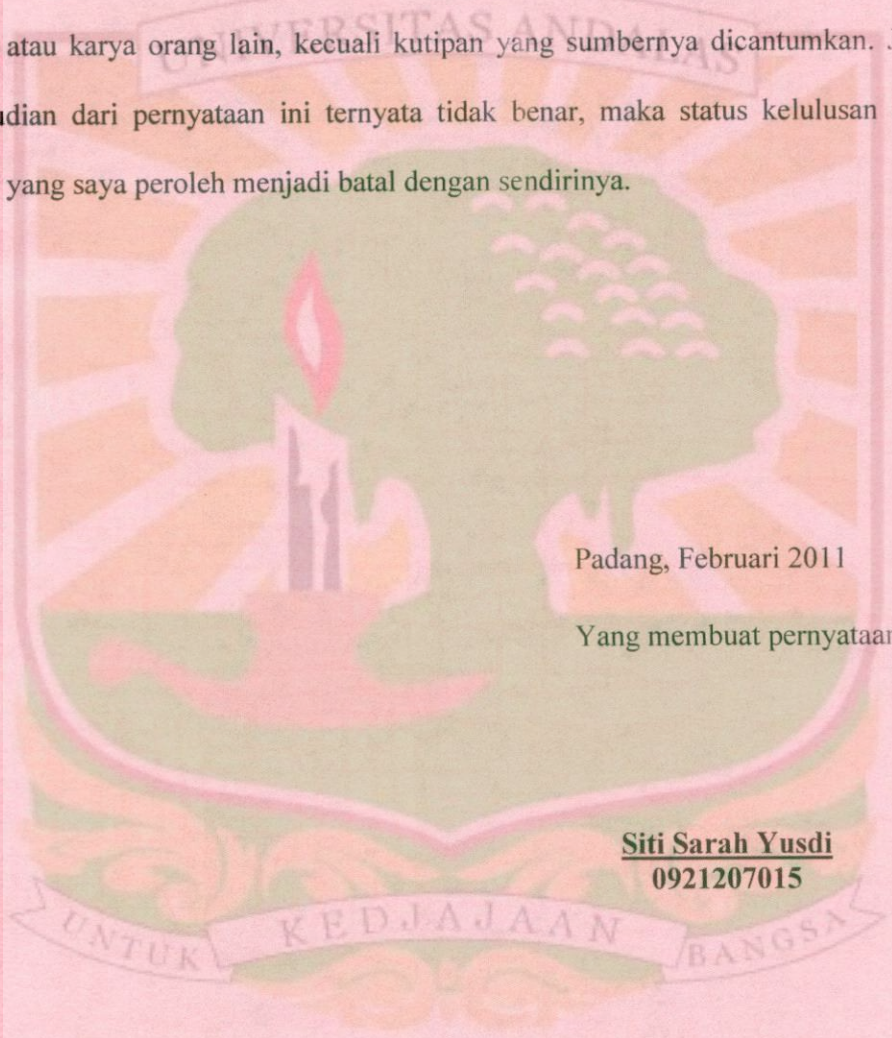
## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Dengan ini saya menyatakan bahwa isi tesis yang saya tulis dengan Judul **Karakterisasi Molekuler Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Bakteriosin dengan Gen 16S rRNA dari Fermentasi Kakao Varietas Hibrid (*Trinitario*) di Sumatera Barat** adalah hasil atau karya saya, bukan merupakan ciplakan dari hasil atau karya orang lain, kecuali kutipan yang sumbernya dicantumkan. Jika kemudian dari pernyataan ini ternyata tidak benar, maka status kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya.

Padang, Februari 2011

Yang membuat pernyataan,

**Siti Sarah Yusdi**  
**0921207015**

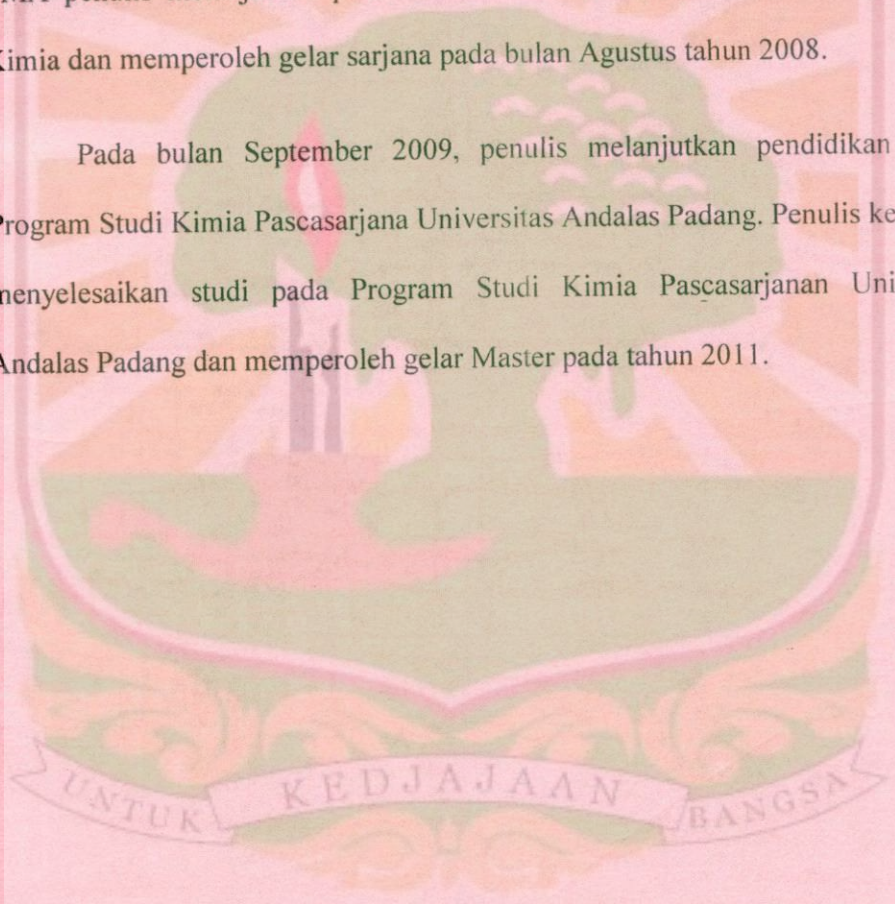




## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 24 Juli 1985 di Padang Sumatera Barat, sebagai anak pertama dari pasangan Dr. Muhammad Yusdi, M.Hum dan Hermes Mukhtar. Penulis menamatkan Sekolah Dasar pada tahun 1997 di SD Negeri Ngabean 01 Yogyakarta, penulis melanjutkan pendidikan SLTP di Adabiah Padang. Kemudian penulis melanjutkan ke SMA Adabiah Padang dan lulus pada tahun 2003. Tamat SMA penulis melanjutkan pendidikan di Universitas Andalas Padang Jurusan Kimia dan memperoleh gelar sarjana pada bulan Agustus tahun 2008.

Pada bulan September 2009, penulis melanjutkan pendidikan S2 di Program Studi Kimia Pascasarjana Universitas Andalas Padang. Penulis kemudian menyelesaikan studi pada Program Studi Kimia Pascasarjana Universitas Andalas Padang dan memperoleh gelar Master pada tahun 2011.





TESIS INI KU PERSEMBAHKAN BUAT PAPA, MAMA DAN ADIK KU  
TERSAYANG. TERIMAKASIH ATAS DO'A, PERHATIAN, DUKUNGAN  
DAN KASIH SAYANG YANG TELAH DIBERIKAN SEHINGGA AKU BISA  
MENGHASILKAN KARYA SEINDAH INI. DO'A MU PAPA, MAMA YANG  
MEMBUAT KU BERHASIL HINGGA SEKARANG. JASAMU AKAN KU  
INGAT SLALU.

TERIMAKASIH KU PERSEMBAHKAN UNTUK OM EDI DAN TANTE ET,  
ATAS SEMANGAT DAN NASEHATNYA SEHINGGA AKU TAK KENAL  
LELAH DALAM PERJALANAN STUDI INI.

*THE FIRST AND THE MOST IMPORTANT STEP  
TOWARDS SUCCESS IS THE FEELING THAT WE CAN  
SUCCED*

( SITI SARAH YUSDI )



## KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah subhanallahuwata'ala karena telah memberikan rahmat dan hidayah-NYA sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Karakterisasi Molekuler Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Bakteriosin dengan Gen 16S rRNA dari Fermentasi Kakao Varietas Hibrid (*Trinitario*) di Sumatera Barat”**.

Penulisan tesis ini tidak lepas dari dukungan semua pihak, baik moril maupun spiritual sehingga menghasilkan karya ilmiah yang baik. Oleh sebab itu, penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada;

- Prof. Dr. Sumaryati Syukur, M.Sc. Ph.d selaku pembimbing I yang telah banyak memberikan ilmu, motivasi dan pengalaman yang berharga bagi penulis.
- Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Jamsari, MP selaku pembimbing II yang senantiasa mengarahkan penulis dalam pengerjaan di laboratorium serta dalam penulisan tesis ini.
- Prof. Dr. H Novirman Jamarun, M.Sc sebagai direktur Pascasarjana Universitas Andalas.
- Dr. H. Djaswir Darwis, MS. DEA selaku Ketua Program Studi Kimia Pascasarjana Universitas Andalas.
- Prof. Dr. H. Abdi Dharma, M.Sc., Prof. Dr. Syukri Arief, M.Sc., Prof. Dr. H. Yunazar Manjang, M.Sc., Prof. Dr. H. Sanusi Ibrahim, M.Sc., dan Dr. Syukri Derajat, M.Sc. yang telah memberikan banyak ilmu berharga



## DAFTAR ISI

<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>i</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>iii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>vi</b>
<b>I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Perumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan Penelitian .....	3
1.4. Hipotesis .....	4
1.5. Manfaat Penelitian .....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1. Kakao Hibrid.....	5
2.2. Fermentasi Asam Laktat .....	9
2.3. Probiotik .....	9
2.4. Bakteri Asam Laktat (BAL) .....	10
2.5. Bakteriosin.....	14
2.6. SDS-PAGE .....	18
2.7. Amplifikasi Gen 16 S rRNA .....	20
2.8. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	23
<b>III. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>27</b>
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian .....	27
3.2. Alat dan Bahan.....	27
3.3. Prosedur dan Cara Kerja .....	28
3.3.1. Fermentasi kakao hibrid.....	28
3.3.2. Sterilisasi alat yang digunakan .....	28
3.3.3 Persiapan dan pembuatan media .....	29
3.3.4. Isolasi BAL dari kakao varietas hibrid dengan metode konvensional .....	30
3.3.5. Identifikasi morfologi BAL.....	31

3.3.6. Uji aktivitas antimikroba .....	31
3.3.7. Optimasi pembentukan bakteriosin.....	32
3.3.8 Isolasi dan penentuan berat molekul bakteriosin dengan SDS-PAGE .....	32
3.3.9. Isolasi DNA genomik bakteri .....	33
3.3.10. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR .....	34
3.3.11. Gel elektroforesis .....	35
3.3.12 Sekuensing DNA .....	35
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>36</b>
4.1 Isolasi BAL dari fermentasi kakao varietas hibrid .....	36
4.2 Uji antimikroba .....	38
4.3 Optimasi pembentukan bakteriosin .....	43
4.4 Isolasi dan penentuan berat molekul bakteriosin .....	49
4.5 Isolasi DNA genomik bakteri .....	50
4.6. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR .....	51
4.7 Analisis sekuen gen 16S rRNA isolat H4 .....	53
<b>V. PENUTUP .....</b>	<b>56</b>
5.1 Kesimpulan .....	56
5.2 Saran .....	56
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>57</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>62</b>



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kandungan zat pada kakao sebelum dan sesudah fermentasi .....	8
2. Bakteri asam laktat yang digunakan sebagai probiotik .....	12
3. Karakteristik 3 grup genus <i>Lactobacillus sp</i> .....	13
4. Perbedaan utama bakteriosin dan antibiotik .....	17
5. Klasifikasi bakteriosin .....	18
6. Primer universal gen 16S rRNA .....	22
7. Komposisi reagen untuk pembuatan gel polyacrylamida SDS-PAGE .....	33
8. Jumlah koloni dalam satuan cfu/ml dengan menggunakan koloni <i>counter</i> .....	37
9. Hasil analisis sekuen isolat H4 dengan menggunakan BLAST .....	53



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tanaman <i>Theobroma Cacao</i> (1) Jenis <i>Criollo</i> , (b) Jenis <i>Forestro</i> , (c) jenis <i>Hibrid</i> .....	7
2. Struktur bakteriosin dari bakteri <i>Lactococcus</i> .....	16
3. SDS poliakrilamid gel elektroforesis (SDS-PAGE) .....	19
4. Gen ribosomal RNA .....	21
5. Skema kerja PCR .....	25
6. Skema kerja fermentasi kakao varietas hibrid .....	28
7. Isolat BAL pada media MRS agar .....	36
8. Hasil pewarnaan gram BAL .....	38
9. Grafik hasil pengamatan zona hambat ke-8 isolat BAL terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39
10. Hasil pengamatan zona hambat ke-8 isolat BAL terhadap bakteri <i>Eschericia coli</i> .....	40
11. Hasil pengamatan zona hambat ke-8 isolat BAL terhadap bakteri <i>Streptococcus sp</i> .....	41
12. Hasil pengamatan zona hambat ke-8 isolat BAL terhadap bakteri <i>Pseudomonas sp</i> .....	41
13. Hasil pengamatan zona hambat antibiotik terhadap ke-4 bakteri patogen ...	42
14. Grafik hasil pengamatan zona hambat isolat H2 terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	44
15. Grafik hasil pengamatan zona hambat siloat H3 terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	45
16. Grafik hasil pengamatan zona hambat isolat H4 terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	45
17. Grafik hasil pengamatan zona hambat isolat H2 terhadap bakteri <i>Streptococcus sp</i> .....	46
18. Grafik hasil pengamatan zona hambat isolat H3 terhadap bakteri <i>Streptococcus sp</i> .....	47
19. Grafik hasil pengamatan zona hambat isolat H4 terhadap bakteri <i>Streptococcus sp</i> .....	47



20. Hasil SDS PAGE bakteriosin .....	49
21. Produk DNA dilihat dengan elektroforesis .....	51
22. Visualisasi produk amplifikasi dengan PCR DNA .....	52
23. Pohon filogenetik isolate H4 dengan ClustalW.....	54



## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Fermentasi biji kakao akan menghasilkan prekursor cita rasa, mencokelat-hitamkan warna biji, mengurangi rasa-rasa pahit, asam, manis dan aroma bunga, meningkatkan aroma kakao (cokelat) dan kacang (*nutty*). Biji yang tidak difermentasi tidak akan memiliki senyawa prekursor tersebut sehingga cita rasa dan mutu biji sangat rendah. Fermentasi pada biji kakao terjadi dalam dua tahap yaitu fermentasi anaerob dan fermentasi aerob. Keberadaan asam sitrat membuat lingkungan *pulp* jadi asam, sehingga akan menginisiasi pertumbuhan ragi dan terjadi fermentasi secara anaerob. Fermentasi aerob diinisiasi oleh bakteri asam laktat (BAL) dan bakteri asam asetat. *Pulp* pada kakao sebelum fermentasi mengandung air 72-79%, garam 8-10%, pentose 2-3%, asam sitrat 1-2% dan sukrosa 10-13%. Produk fermentasi yang dihasilkan berupa etanol, asam laktat, dan asam asetat yang akan berdifusi ke dalam biji dan membuat biji tidak berkecambah (Suryani, 2007)

Dalam proses fermentasi dihasilkan mikroorganisme salah satunya adalah Bakteri Asam Laktat (BAL). BAL didefinisikan sebagai bakteri pembentuk asam laktat dalam metabolisme karbohidrat dan terdiri dari berbagai macam kelompok bakteri gram positif. BAL mempunyai peranan penting dalam pengawetan bahan pangan dan melawan bakteri patogen melalui senyawa peptida antimikroba. BAL umumnya digunakan sebagai starter untuk fermentasi daging dan sayuran, industri fermentasi saos, bahan flavor, dan juga berperan dalam perubahan aroma, warna,



serta kualitas nutrisi produk fermentasi. BAL dikenal sebagai *Food Grade Microorganism* atau dikenal sebagai mikroorganisme yang *Generally Recognized As Safe* (GRAS) yaitu mikroorganisme yang tidak beresiko terhadap kesehatan dan bahkan berguna bagi kesehatan (Surono, 2004)

BAL bisa bermanfaat sebagai pengawet makanan karena mampu memproduksi asam organik, menurunkan pH lingkungan dan mengekskresikan senyawa yang mampu menghambat bakteri atau mikroorganisme patogen seperti  $H_2O_2$ , diasetil,  $CO_2$ , asetaldehid, asam-asam amino dan bakteriosin. BAL tergolong ke dalam bakteri probiotik, karena melihat manfaat dan kandungan yang terdapat di dalamnya. Probiotik adalah suplemen mikroba hidup yang memberikan efek positif kepada manusia atau hewan dengan memperbaiki keseimbangan mikroflora usus (Surono, 2004)

Salah satu senyawa yang dihasilkan oleh BAL adalah bakteriosin. Bakteriosin merupakan senyawa protein yang diekskresikan oleh bakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri lain terutama yang memiliki kekerabatan erat secara filogenik. Bakteriosin mudah terdegradasi oleh enzim proteolitik dalam pencernaan manusia dan hewan. Penelitian baru semakin banyak berkembang sehingga semakin banyak pula jenis bakteriosin baru yang ditemukan. Bakteriosin tersebut dapat digunakan sebagai antibiotik alami, karena memiliki kemampuan sebagai antibakteri patogen yang dapat menghancurkan sel-sel bakteri tersebut sehingga perkembangannya terganggu.

Isolasi BAL dan bakteriosin telah banyak dilakukan penelitiannya terutama pada produk daging mentah, fermentasi susu (yoghurt, dadih, keju),

fermentasi tempe dan tape (Syukur, 2006). Beberapa literatur menyatakan bahwa pada buah-buahan, salah satunya adalah kakao berpotensi adanya BAL melihat kandungan yang ada di dalamnya (Misgiyarta dan Widowati, 2005)

Peneliti sebelumnya juga telah melakukan isolasi dan identifikasi BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada biscuit blondo dengan parameter ujinya, yaitu, uji antimikroba dengan bakteri patogen, isolasi bakteriosin, dan amplifikasi gen 16S rRNA (Deswita, 2010). Namun pada fermentasi kakao varietas hibrid belum pernah dilakukan mengingat kandungan *pulp* yang mengandung tumbuhnya BAL yang sangat berguna bagi kesehatan mikroflora usus.

Berdasarkan hal di atas peneliti tertarik untuk melakukan penyelidikan BAL yang diisolasi dari fermentasi kakao varietas hibrid (*Trinitario*) yang meliputi, uji antimikroba terhadap bakteri pathogen, isolasi bakteriosin dan karakterisasi BAL dengan amplifikasi gen 16S rRNA.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Masih belum adanya penelitian lebih lanjut mengenai karakterisasi molekular BAL penghasil bakteriosin pada proses fermentasi kakao varietas hibrid (*trinitario*) dan bagaimana potensinya dalam membunuh bakteri patogen.

## **1.3 Tujuan penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah isolasi dan penentuan berat molekul bakteriosin, menguji aktifitas antimikroba dari bakteriosin terhadap bakteri patogen serta mengkarakterisasi molekular BAL penghasil bakteriosin dari fermentasi kakao hibrid (*Trinitario*).



#### 1.4 Hipotesis

Diduga BAL yang terdapat pada fermentasi kakao hibrid dapat menghasilkan produk potensial bakteriosin yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

#### 1.5 Manfaat penelitian

Manfaat penelitian ini adalah :

1. Dapat mengetahui kemampuan BAL dalam menghasilkan bakteriosin dengan menghambat pertumbuhan bakteri patogen.
2. Mengetahui spesies BAL penghasil bakteriosin dari fermentasi kakao hibrid
3. Sebagai sumber informasi karakteristik bakteriosin yang dapat menghambat bakteri patogen sehingga dapat digunakan sebagai biopreservasi makanan dan antibiotik alami.
4. Sebagai informasi spesies BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada fermentasi kakao hibrid sehingga menambah koleksi pada database penelitian BAL dan dapat dimanfaatkan sebagai pangan probiotik..

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kakao Hibrid (*Trinitario*)

Tanaman kakao (*Theobroma cacao*) berasal dari Amerika Tengah dan Amerika Selatan, kemudian tersebar ke Asia termasuk Indonesia dan Afrika. Di Indonesia tanaman kakao berkembang dari Sangir dan Minahasa dan akhirnya menyebar ke seluruh Indonesia. Tanaman kakao merupakan salah satu komoditi ekspor non migas dari subsektor perkebunan yang sedang dipacu perkembangannya di Indonesia. Indonesia memiliki posisi ketiga sebagai Negara penghasil kakao terbesar didunia setelah Brazil dan Ivory Coast, serta memiliki prospek cukup cerah, sebab permintaan dalam negeri juga semakin meningkat dengan semakin kuatnya perkembangan sektor agroindustri (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Hasil Pertanian, 1990). Disamping itu, persaingan kakao dipasar dunia juga semakin tajam. Maka dewasa ini tanaman kakao semakin intensif dibudayakan, baik oleh perusahaan perkebunan negara, swasta maupun perkebunan rakyat (Kim dkk, 1983)

Kakao merupakan salah satu komoditi yang penting bagi perekonomian. Sumatera Barat merupakan salah satu daerah penghasil tanaman kakao, dengan luas lahan perkebunan mencapai 21.139 hektar. Pada tahun 2010 diharapkan Sumatera Barat menjadi sentra kakao Sumatera Bagian Tengah dengan luas lahan perkebunan 108 hektar. Perkebunan kakao ini terdapat di berbagai daerah, baik berupa perkebunan yang dikelola oleh swasta atau pemerintah. Areal tanaman kakao yang terluas di Sumatera Barat terdapat di Kabupaten Pasaman Barat, yaitu



sekitar 3000 Ha dengan jumlah 1,3 ribu ton, rata-rata produksi kakao mencapai 0,4 ribu kg/Ha pada tahun 1996 (Othman dkk, 2005).

Kakao (*Theobroma cacao*) merupakan tanaman yang menumbuhkan bunga dari batang atau cabang. Karena itu tanaman ini digolongkan ke dalam kelompok tanaman *caulifloris*. Pada awal pertumbuhan, tanaman kakao yang diperbanyak melalui biji akan menumbuhkan batang utama sebelum menumbuhkan cabang-cabang primer. Berikut adalah taksonomi tanaman kakao

Divisio	: <i>Spermatophyta</i>
Sub divisio	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Sub kelas	: <i>Dialypetalae</i>
Ordo	: <i>Malvales</i>
Famili	: <i>Sterculiaceae</i>
Genus	: <i>Theobroma</i>
Spesies	: <i>Theobroma cacao</i> Linn

(Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Hasil Pertanian, 1990).

Kakao dapat dibagi atas tiga kelompok besar dan jenis tersebut yang terbanyak dibudidayakan (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Hasil Pertanian, 1990), yaitu :

1. *Criollo*, atau yang dikenal juga dengan kakao varietas hijau merupakan tanaman kakao yang pertumbuhannya kuat, daya hasil rendah, relatif gampang terserang hama dan penyakit. Permukaan kulit buah kasar, berbenjol-benjol dan alur-alurnya jelas. Kulit buah tebal tapi lunak, sehingga mudah dipecah. Kadar lemak biji rendah, ukuran biji besar, bentuknya bulat dan mempunyai

cita rasa khas yang baik sehingga dikenal sebagai kakao mulia, *fine flavour cocoa*, *chiced cocoa* atau *edel cocoa*.

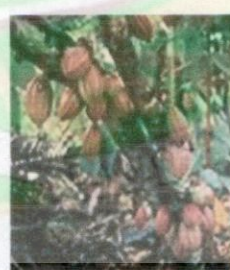
2. *Forestero*, atau yang disebut juga dengan kakao varietas merah merupakan tanaman kakao yang pertumbuhannya kuat dan cepat, daya hasil tinggi, relatif tahan terhadap hama dan penyakit. Permukaan kulit buah relatife halus karena alur-alurnya dangkal. Kulit buah tipis tetapi keras (liat), kadar lemak tinggi, bentuk biji lonjong (oval), pipih, dan keping biji berwarna ungu gelap. *Forestero* menghasilkan kakao bermutu sedang dan dikenal sebagai *ordinary cocoa*, *bulked cocoa* atau kakao lindak.
3. *Trinitario*, merupakan tanaman kakao hibrid alami dari *Criollo* dan *Forestero*, sehingga menghasilkan biji kakao yang dapat termasuk *fine flavour cocoa* atau *bulk cocoa*. Jenis *Trinitario* yang banyak ditanam di Indonesia adalah Hibrid Djati Runggo (DR) dan Uppertimazone Hybrida (Kakao lindak) (Baron dkk, 2005). *Trinitario* juga merupakan tanaman coklat yang paling banyak dugunakan karena produksinya tinggi dan cepat sekali mengalami fase generatif (Tumpal dkk, 2009)



1



2



3

**Gambar 1.** Tanaman *Theobroma Cacao* (1) Jenis *Criollo*, (b) Jenis *Forestro*, (c) jenis Hibrid (*Trinitario*)



Lingkungan alami kakao adalah hutan tropis. Area penanaman kakao yang ideal adalah daerah dengan curah hujan 1100-3000 mm pertahun (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Hasil Pertanian, 1990).

Kakao varietas hibrid (*Trinitario*) memiliki beberapa keunggulan dari kakao varietas hijau dan merah, diantaranya; tergolong kakao *fine flavour cocoa* dan *bulk cocoa*, pertumbuhan cepat, merupakan varietas unggulan karena hasil persilangan varietas hijau dan merah, buah dan biji yang berkualitas baik, ukuran embrio lebih besar, toleran terhadap penyakit busuk buah, beradaptasi cukup luas terhadap ketinggian, dapat dibudidayakan dari 0-650 m, dan kadar lemak yang stabil.

**Tabel 1.** Kandungan zat pada kakao sebelum dan sesudah fermentasi (Sumber : Fleet, 2003)

Komponen (mg/g)	Konsentrasi			
	Sebelum fermentasi		Sesudah fermentasi	
	pulp	Biji	Pulp	Biji
<b>Kakao Hibrid (<i>Trinitario</i>)</b>				
Fruktosa	42	0,8	9	0,3
Glukosa	24	0,6	5	0,1
Sukrosa	21	18	0	0
Etanol	0,3	0,2	1,6	1,6
Asam Sitrat	21	7,4	9	3,5
Asam Laktat	0,3	0,1	5	1,8
Asam Asetat	0,4	0,7	10	15
<b>Kakao Hijau (<i>Forestero</i>)</b>				
Fruktosa	62	1.0	11	0.4
Glukosa	41	0.7	7	0,1
Sukrosa	32	19	0	0
Etanol	0,5	0,2	0.1	0,4
Asam Sitrat	24	9	11	4
Asam Laktat	0,3	0,1	6	2
Asam Asetat	0,4	1	12	25

## 2.2 Fermentasi Asam Laktat

Berbagai jenis makanan fermentasi baik tradisional maupun modern melibatkan bakteri asam laktat. Secara umum, makanan fermentasi lebih awet dari bentuk segarnya karena kondisi asam tidak disukai oleh bakteri kontaminan. Selama fermentasi produk intermediat yang terbentuk dari katabolisme senyawa organik seperti glukosa berperan sebagai aseptor elektron terakhir menyebabkan terbentuknya senyawa produk akhir fermentasi yang stabil. Sebagai contoh, pada umumnya mikroorganisme mengubah gula menjadi asam piruvat (Surono, 2004)

Fermentasi merupakan proses produksi energi dalam sel yang terjadi secara anaerob. Seperti fruktosa dan sukrosa, ketika di fermentasi dalam kondisi anaerob akan menghasilkan etanol, asam laktat, dan hidrogen (Stanbury, 1984).

## 2.3 Probiotik

Probiotik berasal dari kata probios yang dalam ilmu biologi berarti kehidupan. Probiotik adalah pangan mengandung mikroorganisme hidup yang secara aktif meningkatkan kesehatan dengan cara memperbaiki keseimbangan flora usus jika dikonsumsi dalam keadaan hidup dalam jumlah yang memadai. Untuk dapat dikatakan probiotik, bakteri harus memenuhi syarat; terbukti aman bagi manusia, dapat mencapai usus dalam keadaan hidup, dan terbukti bermanfaat (Fulle, 1992).

Probiotik merupakan bakteri hidup yang diberikan sebagai suplementasi makanan. Pemberian probiotik dapat berpengaruh menguntungkan bagi kesehatan dimana probiotik menghasilkan senyawa-senyawa inhibitor seperti asam laktat



dan asetat yang menyebabkan suasana usus menjadi asam serta  $H_2O_2$  dan bakteriosin yang memberikan efek antagonis terhadap pertumbuhan bakteri patogen sehingga menurunkan pertumbuhan dan patogenitas bakteri tersebut serta memperbaiki keseimbangan mikroflora usus. Mikroflora yang digolongkan sebagai probiotik terutama dari golongan *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* (Syukur, 2006 dan Haryanto, 2005).

#### 2.4 Bakteri Asam Laktat (BAL)

BAL merupakan bakteri asam laktat yang diperoleh dari hasil fermentasi. BAL mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat. Efek bakterisidal dari asam laktat berkaitan dengan penurunan pH 3 sampai 4,5 sehingga pertumbuhan bakteri lain termasuk bakteri pembusuk akan terhambat (Buckle, 1987). Pemanfaatan BAL telah banyak dilakukan manusia, umumnya pada proses fermentasi makanan. BAL merupakan kelompok besar bakteri menguntungkan memiliki sifat yang relatif sama. Saat ini BAL digunakan sebagai pengawet dan memperbaiki tekstur serta cita rasa bahan pangan. BAL mampu memproduksi asam laktat sebagai produk akhir perombakan karbohidrat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin (Afrianto, 2006).

BAL termasuk dalam kelompok bakteri baik bagi manusia, dan umumnya memenuhi status GRAS (*Generally Recognized As Safe*), yaitu aman bagi manusia. Kelompok bakteri ini tidak membusukkan protein, dan dapat memetabolisme berbagai jenis karbohidrat secara fermentatif menjadi asam laktat sehingga disebut bakteri asam laktat. Jadi makanan yang tercemar oleh bakteri asam laktat menjadi rusak karena asam, dan akan menjadi busuk kalau kemudian juga dicemari oleh bakteri pembusuk.

BAL memiliki ciri-ciri bersifat gram positif, tidak membentuk flora, dapat membentuk koki, kokobacili atau batang, non-motil atau sedikit motil, mikroaerofilik sampai anaerob, tahan terhadap asam, membutuhkan suhu mesofilik (Salminen dan Von Wright, 1998).

Sifat terpenting dari bakteri asam laktat ini adalah kemampuannya memfermentasi gula menjadi asam laktat. Produksi asam inilah yang pada akhirnya dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain yang tidak diinginkan dan membantu meningkatkan absorpsi mineral (termasuk kalsium). Penurunan absorpsi mineral terjadi akibat gerakan peristaltik usus yang semakin cepat. Namun, tidak semua bakteri asam laktat dapat di klaim sebagai probiotik.

Menurut Rostini (2007) ada beberapa persyaratan agar bakteri asam laktat dapat diklasifikasikan ke dalam bakteri probiotik, yakni :

1. Stabil terhadap asam terutama (asam lambung) dan garam empedu
2. Mampu bertahan hidup selama berada di bagian atas usus kecil
3. Dapat memproduksi senyawa antimikroba
4. Dapat menempel dan mengkolonisasi sel manusia
5. Tumbuh baik dan berkembang dalam saluran pencernaan
6. Aman digunakan oleh manusia
7. Mampu membentuk lingkungan mikroflora yang normal dan seimbang.

Bakteri yang termasuk kelompok BAL adalah *Aerococcus*, *Allococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, dan *Vagococcus* (Rostini, 2007). Mereka pada umumnya mempunyai potensi untuk digunakan sebagai probiotik.



**Tabel 2.** Bakteri Asam Laktat yang digunakan sebagai probiotik  
(Sumber : Goldin, 1998)

Genus	Spesies
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. cellobiosus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. alivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>S. intermedius</i>
<i>Leuconostoc</i>	-
<i>Pediococcus</i>	-

Beberapa jenis Bakteri Asam Laktat ada yang menjadi penduduk asli saluran pencernaan, seperti *enteric lactic acid bacteria*, diantaranya *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* dan *Bifidobacterium infantis* (pada bayi) dan beberapa jenis lainnya. Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan kelangsungan hidup bakteri asam laktat sangat beragam, namun komposisi kimia dan kandungan nutrisi pada media sangat berpengaruh. Bakteri asam laktat memerlukan beberapa asam amino dan vitamin.

Secara fisiologis dan berdasarkan aktivitas metabolismenya, bakteri asam laktat dikelompokkan kedalam dua group, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif.

1. Bakteri asam laktat homofermentatif, melibatkan jalur Embden Meyerhof yaitu glikolisis menghasilkan asam laktat, 2 mol ATP dari 1 molekul glukosa/heksosa dalam kondisi normal, tidak menghasilkan CO<sub>2</sub> dan menghasilkan biomassa sel dua kali lebih banyak dari pada bakteri asam laktat heterofermentatif.

**Tabel 2.** Bakteri Asam Laktat yang digunakan sebagai probiotik  
(Sumber : Goldin, 1998)

Genus	Spesies
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. cellobiosus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. alivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>S. intermedius</i>
<i>Leuconostoc</i>	-
<i>Pediococcus</i>	-

Beberapa jenis Bakteri Asam Laktat ada yang menjadi penduduk asli saluran pencernaan, seperti *enteric lactic acid bacteria*, diantaranya *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* dan *Bifidobacterium infantis* (pada bayi) dan beberapa jenis lainnya. Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan kelangsungan hidup bakteri asam laktat sangat beragam, namun komposisi kimia dan kandungan nutrisi pada media sangat berpengaruh. Bakteri asam laktat memerlukan beberapa asam amino dan vitamin.

Secara fisiologis dan berdasarkan aktivitas metabolismenya, bakteri asam laktat dikelompokkan kedalam dua group, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif.

1. Bakteri asam laktat homofermentatif, melibatkan jalur Embden Meyerhof yaitu glikolisis menghasilkan asam laktat, 2 mol ATP dari 1 molekul glukosa/heksosa dalam kondisi normal, tidak menghasilkan CO<sub>2</sub> dan menghasilkan biomassa sel dua kali lebih banyak dari pada bakteri asam laktat heterofermentatif.



2. Bakteri asam laktat heterofermentatif, penguraian glukosa oleh BAL melalui jalur pentose fosfat. Pada fermentasi ini yang bekerja adalah enzim fosfoketolase dan dapat menghasilkan asam laktat 40-50 %, etanol, asam asetat dan CO<sub>2</sub> (Surono, 2004).

Kondisi pertumbuhan yang berbeda bisa menghasilkan produk akhir fermentasi yang berbeda, sebagai akibat dari berubahnya metabolisme piruvat dan penggunaan elektron akseptor eksternal seperti oksigen atau senyawa organik. Genus *Lactobacillus* terdiri dari 70 spesies dan dikelompokkan menjadi 3 sub grup (Tabel 3). Disamping itu genus *Lactobacillus* kebanyakan homofermentatif, namun ada juga yang heterofermentatif. *Lactobacillus* secara umum lebih tahan terhadap asam dibandingkan dengan genus bakteri asam laktat lainnya (Sharpe, 1981; Kandler dan Weiss 1986).

**Tabel 3.** Karakteristik 3 sub grup genus *Lactobacillus* sp. (Sumber : Sharpe, 1981; Kandler dan Weiss 1986)

Karakteristik	Spesies
<b>Homofermentatif</b>	
Produk utama asam laktat (> 85% dari glukosa)	<i>L. acidophilus</i>
tidak menghasilkan gas dari glukosa, mempunyai enzim aldolase, tidak mempunyai fosfoketolase	<i>L. salivarius</i> <i>L. helveticus</i>
1. Tumbuh pada 45°C, tetapi tidak pada 15°C, sel berbentuk batang panjang.	<i>L. delbrueckii</i> <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i>
2. Tumbuh pada 15°C, beberapa tumbuh pada 45°C, batang pendek, mempunyai aldolase dan fosfoketolase, fakultatif heterofermentatif.	<i>L. curvatus</i>
<b>Heterofermentatif :</b>	
Menghasilkan kira-kira 50% asam laktat dari glukosa; menghasilkan CO <sub>2</sub> dan etanol, tidak mempunyai enzim aldolase, mempunyai fosfoketolase; berbentuk batang panjang dan pendek	<i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i> , <i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. kefir</i>

Tabel 3 memperlihatkan bahwa fermentasi homolaktat pada *Lactobacillus* menghasilkan ekuimolar konsentrasi asam laktat dari glukosa, sedangkan heterolaktat menghasilkan lebih dari 50% asam laktat dan juga etanol dan CO<sub>2</sub> sehingga mudah untuk membedakan antara homofermentatif dan heterofermentatif berdasarkan pembentukan gas selama pertumbuhan genus *Lactobacillus sp.* dalam media yang mengandung glukosa. (Nicklin, et.al, 1999) Disamping itu juga dapat dilakukan dengan mengukur nilai keasaman (pH) kultur medium yang tentunya lebih rendah bagi homofermentatif di bandingkan dengan heterofermentatif. Tabel 3 lebih jelas memperlihatkan bahwa suhu pertumbuhan juga bisa digunakan untuk membedakan spesies *Lactobacillus* secara taksonomi (Woolford, 1984)

## 2.5 Bakteriosin

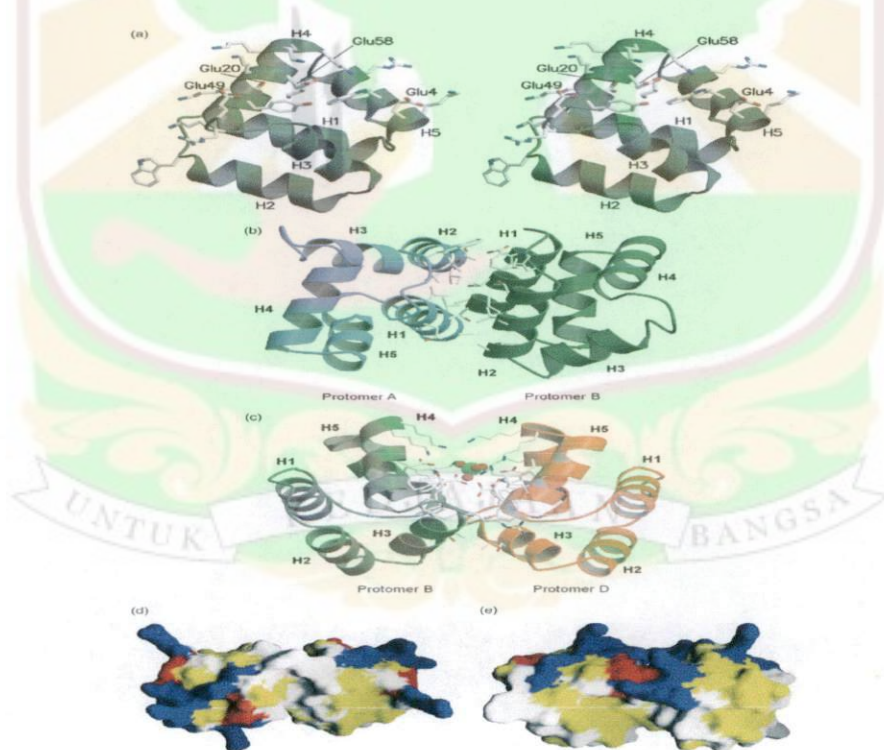
Efek antimikroba bakteri asam laktat telah diperhitungkan sehingga dapat memperpanjang masa simpan berbagai jenis bahan makanan melalui proses fermentasi. Efek dari pengawetan bakteri asam yang paling utama adalah karena dihasilkannya asam laktat yang dapat menurunkan nilai keasaman atau pH bahan makanan. Disamping itu dihasilkan juga senyawa antimikrobia yaitu peptida yang disintesis dalam ribosom yang dikenal sebagai bakteriosin (Martirani dkk, 2002)

Mulanya ditemukan suatu senyawa antibakteri *collicin* yang dihasilkan oleh *E. coli* yang mempunyai efek antagonis terhadap spesies lain. Antimikrobia dari grup *N. streptococi* (sekarang disebut *Lactococcus*) yang menghambat pertumbuhan *Lactobacilli* pertama kali dilaporkan oleh Rogers pada tahun 1928.



Kemudian Whitehead pada tahun 1933, mengidentifikasi bahwa senyawa antibakteri ini adalah sejenis protein.

Beberapa jenis bakteri asam laktat menghasilkan bakteriosin, yakni suatu peptida yang bersifat antibakteri, toksin yang berupa protein yang dapat mencegah pertumbuhan bakteri sejenis. Kriteria bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri gram positif menurut Tagg dkk (1976), yaitu suatu jenis protein, bersifat bakterisida tidak hanya bakteriostatik (membunuh bakteri bukan hanya menghambat, sebagai akibat lemahnya *Proton Motive Force* (PMF) dan hilangnya kemampuan potensi membran, mencegah pertumbuhan bakteri sejenis, dan mempunyai tempat pelekatan yang spesifik bagi patogen, yang membedakannya dengan senyawa antimikroba lainnya.



**Gambar 2.** Struktur bakteriosin dari bakteri *Lactococcus* (Whitehead, 1933)

Bakteriosin dihasilkan baik oleh bakteri gram-positif maupun bakteri gram-negatif. Bakteri gram-positif mengandung 30 sampai 60 asam amino dengan aktivitas yang bervariasi dari spektrum sempit sampai luas dalam melawan bakteri gram positif lain bahkan ada yang bereaksi dengan bakteri gram negatif (Jack dkk, 1995). Penamaan bakteriosin umumnya disesuaikan dengan bakteri penghasilnya, seperti *Lactococcin A*, *Lactococcin G*, *Lactococcin 972* dihasilkan oleh bakteri *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* (*Enterococcus faecalis*), *Aurecin* (*Staphylococcus aureus*), *Lactacin* (*Lactobacillus acidophilus*), dan sebagainya. Penggunaan istilah bakteriosin sering dikacaukan dengan istilah antibiotik dan antimikroba. Antibiotik adalah zat kimia yang dihasilkan oleh berbagai mikroorganisme.

Bakteriosin adalah zat kimia berupa peptida atau protein yang dihasilkan oleh bakteri sedangkan antimikroba disamping zat kimia yang dihasilkan oleh berbagai mikroorganisme (antibiotik, bakteriosin) juga substansi yang diperoleh secara sintetik. Bakteriosin secara umum berbeda dengan antibiotik dalam hal sintesis, mekanisme kerja, spektrum dan tujuan pemakaian. Tabel 4 (Suparjo, 2008).

Mekanisme kerja bakteriosin melawan bakteri lain secara umum dengan menyerang membran sitoplasma (Monville dan Chen, 1998) melalui pembentukan pori membran sitoplasma (Sablón, 2000) dan penembusan membran sel sehingga meningkatkan permeabilitas membran sitoplasma (Jack dkk 1995).



**Tabel 4.** Perbedaan utama bakteriosin dan antibiotik (Sumber: Cleveland dkk, 2001).

Karakteristik	Bakteriosin	Antibiotik
Aplikasi	Pangan	Klinikal
Sintesis	Ribosomal	Dinding sel
Aktifitas	Spektrum sempit	Spektrum luas
Imunitas sel induk semang	Ya	Tidak
Mekanisme sel target	Biasanya penyesuaian sel yang dipengaruhi	Biasanya pemindahan sel secara genetik
Kebutuhan interaksi	Docking molekul	Target khusus
Mekanisme Kerja	Sebagian besar pembentukan pori, dan beberapa dalam biosintesis dinding sel	Membran sel atau target intraseluler
Efek samping	Belum diketahui	Ya

Bakteriosin dikelompokkan menjadi 4 kelas, yaitu Kelas I Lantibiotik yang merupakan peptida rantai pendek, suatu asam amino yang sangat khusus (misalnya nisin, suatu residu 34 peptida yang sangat aktif terhadap kebanyakan bakteri gram positif) dan memiliki berat molekul <5 kDa. Kelas II, bakteriosin yang mengandung Lantionin seperti *Lactococcus*, *Pediocins*, dan *Laucocin A*, merupakan peptida berberat atom rendah yang tahan panas, terdiri dari 44 asam amino dan memiliki berat molekul < 10 kDa. Bakteriosin kelas III, protein, peptida berberat atom tinggi yang tidak tahan panas dengan berat molekul > 30 kDa, dan kelas IV merupakan kompleks bakteriosin yang tidak diketahui dengan baik identitasnya (Surono, 2004).

**Tabel 5.** Klasifikasi bakteriosin (Sumber : Cleveland, dkk.(2001) : Oscarriz dan Pisabarro (2001), Chen dan Hoover (2003)

Kelompok	Karakteristik	Contoh Bakteriosin	Bakteri Penghasil
I	A	Molekul Kecil (2-5 kDa) Mengandung asam amino Lanthionine- $\beta$ methyllanthionin, bermuatan positif berbentuk ulir	<i>Nicin</i> <i>Ephidermin</i> <i>Lactocin S</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Staphylococcus ephidermis</i> <i>Lactobacillus sake</i>
	B	Molekul kecil (< 2 kDa) bermuatan negatif atau netral berbentuk globular	<i>Mersacidin</i> <i>Cynnamycin</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptomyces cinnamomeus</i>
II	a	Peptida anti Listeria	<i>Pediocin PA-1/AcH</i> <i>Sakacin A</i> <i>Pedeococcus Acidalactici</i> <i>H/PAC1.0</i> <i>Lactobacillus sake LB 706</i>
	b	Bakteriosin 2-peptida	<i>Lactocin G</i> <i>Plantacirin A</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobasillus plantarum</i>
III		Molekul besar (> 30 kDa)sensitive terhadap panas	<i>Helveticins J</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>
IV		Bakteriosin yang mengandung protein atau lipid	<i>Lactococcin 27</i> <i>Lacstrecin</i>

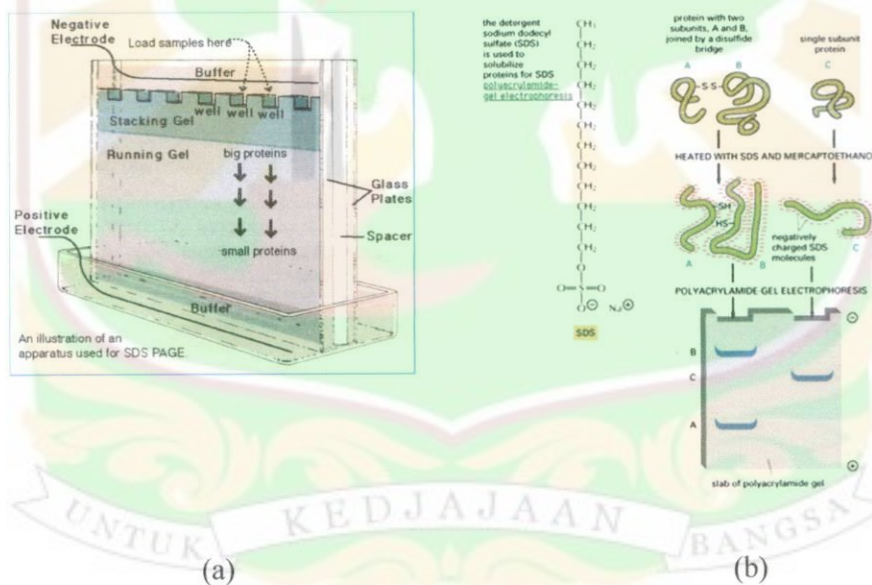
## 2.6 SDS-PAGE

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfonat-Polyacrylamid Gel

*Elektrophoresis*) merupakan metoda yang digunakan untuk mengevaluasi protein hasil isolasi dan memperkirakan sifat-sifat fisik protein, seperti ukuran dan muatan, komposisi sub unit protein dan titik isoelektris. Prinsip kerja berdasarkan migrasi partikel bermuatan melalui medium dibawah pengaruh potensial elektrik (Yekti, 2000)



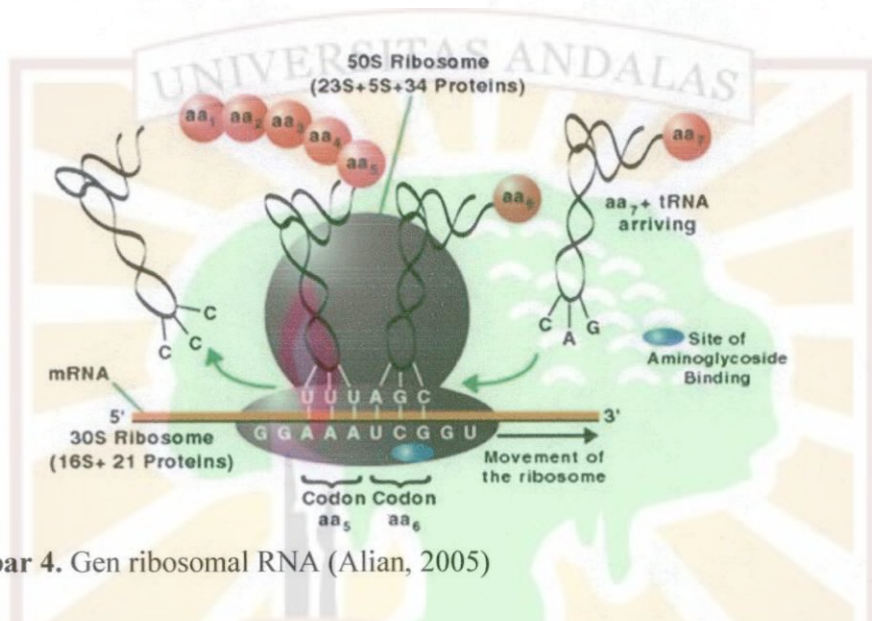
Gel poliakrilamid disini digunakan sebagai matriks inert dimana nantinya protein bermigrasi melewatinya. Ukuran gel disesuaikan dengan molekul protein yang diinginkan. Sedangkan SDS berguna untuk mengikat bagian yang hidrofobik dari molekul protein, sehingga protein tersebut tidak meleku (*unfold*) menjadi rantai polipeptida yang memanjang, protein itu sendiri terlepas dari ikatannya dengan protein lain atau molekul lipid dan dibuat larut lebih bebas di dalam larutan detergen. Penambahan mercaptoetanol di dalamnya berfungsi untuk memutus ikatan disulfida (S-S) pada protein sehingga semua konstituen polipeptida di dalam molekul-molekul multisubunit dapat dianalisis secara terpisah (Darnell dkk, 1990, Albert dkk, 1994 dan homes dkk, 1997).



**Gambar 3.** SDS poliakrilamid gel elektroforesis (SDS-PAGE)

(a) peralatan yang digunakan (b) perubahan protein akibat mercaptoetanol (Sumber; Darnell dkk, 1990)

satuan besarnya pengendapan dari suatu protein, yang diambil dari singkatan Svedberg. Sub unit ribosom bakteri mengandung 16S rRNA dan 21 macam protein dengan berbagai macam tingkat kelarutan. Sedangkan unit besarnya (50S) mengandung 23S rRNA dan 5S rRNA serta 31 protein. Pada eukariot terdapat 18S rRNA dan 28S rRNA serta tipe protein yang lebih banyak (Jamsari, 2007).



**Gambar 4.** Gen ribosomal RNA (Alian, 2005)

Sekuensing gen 16S rRNA telah digunakan untuk analisis filogenetik dan klasifikasi bakteri semenjak tahun 1980-an. Gen 16S rRNA ini dapat digunakan untuk mendisain primer, PCR ataupun sekuensing karena mengandung daerah konservatif yang ada pada setiap organisme. Gen ini mengandung daerah-daerah spesifik yang dapat digunakan untuk identifikasi spesies. Oleh sebab itu, analisis sekuen gen 16S rRNA menjadi teknologi yang sering digunakan untuk identifikasi isolat bakteri dalam diagnosa penyakit (Cai dkk, 2003).

Adanya ketidaksamaan dari dua buah sekuen pada spesies yang sama dapat diketahui dengan mengidentifikasi spesies bakteri menggunakan gen 16S rRNA. Kesamaan sekuen 99-99.5% menunjukkan spesies yang identik



dibandingkan dengan isolat yang mempunyai kesamaan sekuen kecil dari 97% yang berarti telah berbeda taksonominya. Untuk mendapatkan sekuen gen 16S rRNA digunakan primer universal untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA pada sel bakteri (Fox, 1992).

**Tabel 6.** Primer universal 16S rRNA (Jamsari, 2007)

No	Primer	Sequence
1	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
2	518R	GWATTACCGCGGCKGCTGGCAC
3	530F	GTGCCAGCMGCCGCGG
4	907R	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT
5	926F	AAACTYAAAKGAATTGACGG
6	1114F	GCAACGAGCGCAACCC
7	1392R	ACGGGCGGTGTGTRC
8	1525R	AAGGAGGTGWTCCARCC

Keterangan: M=C:A, Y=C:T, K=G:T, R=A:G, W=A:T, I:1

DNA bakteri dapat di ekstrak dengan menggunakan ekstraksi DNA, yang kemudian gen 16S rRNA dan primer universal diamplifikasi dengan PCR selanjutnya di sekuen menggunakan *automatic sequencer*. Untuk analisis pensejajaran sekuen dibandingkan dengan yang telah ada pada *GenBank of National Center of Biotechnology Information* (NCBI) dengan BLAST dan *Multiple-Alignment Analysis* yang dapat diakses secara bebas lewat internet (Jamsari, 2007).

## 2.8 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Kemajuan teknologi di bidang rekayasa genetika dirasakan sangat maju dan berkembang pesat. Teknik pengujian dengan DNA *probe* yang sudah dikenal sangat sensitif dan spesifik, namun masih ada kelemahannya karena membutuhkan jumlah sel, jaringan atau cairan tubuh lainnya dalam jumlah tertentu agar dapat terdeteksi. Jika bahan pemeriksaan yang didapat jumlahnya sangat sedikit, maka dilakukan pembiakan terlebih dahulu. Akan tetapi seringkali pembiakan tidak berhasil dengan baik atau sulit tumbuh dalam medium pembiakan secara *in vitro* sehingga memerlukan metode pemeriksaan yang lain yang lebih akurat, mudah, sensitif dan spesifik. PCR merupakan suatu metode untuk memperbanyak segmen DNA yang spesifik secara enzimatik dan cepat dalam *in vitro*. Setiap kali melakukan satu siklus PCR, DNA akan memperbanyak diri menjadi 2 kali lipat. Dengan demikian jika dilakukan 20 kali siklus, maka DNA yang diperoleh menjadi sebesar dua pangkat 20 atau sama dengan sejuta kali lipat (Jamsari, 2007).

Pada dasarnya PCR merupakan suatu prosedur siklus biokimia untuk memperbanyak segmen DNA secara enzimatik. Proses ini menggunakan enzim DNA polymerase yang stabil pada suhu tinggi. Sampai saat ini, enzim yang sering digunakan adalah *Taq polymerase*. Bahan-bahan yang diperlukan dalam suatu siklus PCR yaitu: segmen DNA yang spesifik, enzim polymerase, primer yang terdiri dari oligonukleotida dan bahan-bahan pembangun DNA (dNTP). Menurut Christanto (2000), tiap proses siklus PCR terdiri dari tiga tahapan yaitu



Tahap I, yaitu denaturasi yang memerlukan suhu tinggi sekitar  $94-95^{\circ}\text{C}$ , untuk memisahkan untai rangkap DNA.

Tahap II, yaitu tahap renaturasi atau *primer annealing* dimana terjadi pendinginan. Suhu yang dibutuhkan sekitar  $37-60^{\circ}\text{C}$  selama beberapa puluh detik, dan terjadi penempelan primer pada ujung 3' DNA yang akan diperbanyak. Setiap primer akan merupakan oligonukleotida yang terdiri dari untai tunggal dan urutan nukleotida. Primer dapat menempel pada DNA karena telah dibuat khusus, sehingga urutan basanya merupakan urutan basa yang komplemen terhadap ujung bagian DNA yang akan diperbanyak.

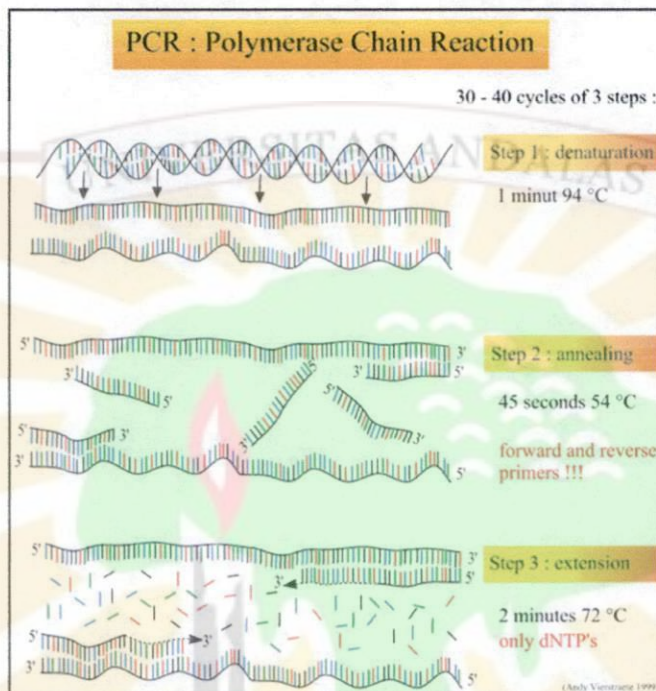
Tahap III, yaitu pemanjangan atau *primer extension*. Dalam tahap ini perlu pemanjangan primer agar dapat terbentuk DNA untai ganda yang lengkap

Pada proses ini memerlukan suhu yang tinggi sekitar  $72^{\circ}\text{C}$ , jika memakai *Taq Polymerase*, sedangkan untuk enzim yang berasal dari *E coli* hanya memerlukan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama beberapa menit (Christanto, 2000). Disamping itu juga perlu diperhatikan tentang kualitas dari primer yang digunakan.

Menurut Jamsari (2007) sebuah primer yang ideal adalah primer yang memiliki kriteria sebagai berikut:

1. Memiliki panjang sekitar 15-35 nukleotida
2. Memiliki titik didih yang relatif tinggi
3. Sekuens primer hanya hadir satu kali pada Temple DNA
4. Tidak berkomplementer dengan primer pasangannya.

5. Tidak membentuk struktur sekunder dengan primer pasangannya.
6. Memiliki proporsi GC dan AT yang seimbang.
7. Primer pasangannya memiliki titik didih yang relatif sama



**Gambar 5.** Skema Kerja PCR (Christanto, 2000)

Tiap proses satu siklus PCR berlangsung membutuhkan waktu sekitar 3-6 menit dan menghasilkan DNA dua kali lipat jumlahnya. Bila melakukan sejumlah X kali siklus PCR maka akan mendapatkan dua pangkat X kali lipat, sehingga dalam beberapa jam saja akan mendapatkan hasil jutaan kali lipat DNA spesifik. Tetapi tidak dianjurkan melakukan perbanyakan lebih dari 40 kali siklus, karena akan terjadi efek pendataran (*plateau*). Pada keadaan tersebut meskipun kita menambahkan siklus PCR, tidak akan menghasilkan DNA yang efektif seperti semula. Untuk mengetahui berhasil tidaknya reaksi PCR, maka dapat dipakai berbagai metode, antara lain bila hasil amplifikasi DNA cukup banyak dipakai



metoda elektroforesis dengan pewarnaan etidium bromida. Metode ini yang paling sering digunakan. Hasil elektroforesis dapat diamati dengan menggunakan sinar ultraviolet (Christanto, 2000).

Metode elektroforesis tidak dapat menentukan identifikasi jika jumlah target pada awal urutan sangat kecil. Keadaan seperti ini mungkin masih dapat diperbanyak dari beberapa urutan-urutan nukleotida yang tidak spesifik dan menghasilkan DNA spesifik yang sangat sedikit untuk dapat dilihat (Christanto, 2000).



### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang serta Laboratorium Biokimia Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Penelitian dilakukan mulai bulan Agustus sampai bulan Januari 2011.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi autoklaf, laminar air flow cabinet, cawan petri, botol reagent, botol media, tabung reaksi, erlenmeyer 250 ml, jarum ose, pipet tetes, bunsen, magnetic stirer dan *hot plate*, *colony counter*, vortex, tabung eppendorf 1,5 dan 2 ml, pipet mikro, tip mikro, mesin PCR, elektroforesis, sentrifuse, gel dokumentasi, peralatan SDS PAGE, *sequencer*, *heater block*, spatula, *oven*, desikator, shaker inkubator, kertas saring, timbangan analitik, kertas label, kertas wrap, dan alat-alat lainnya.

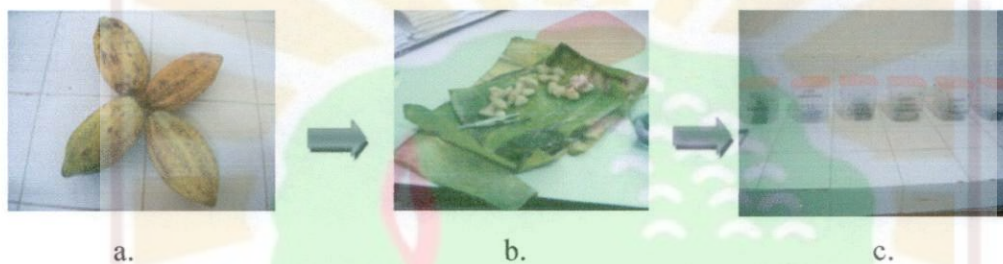
Bahan-bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah kakao hibrid, MRS Agar (Merck), MRS Broth (Merck), Nutrien agar (Himedia, India), larutan fisiologis (NaCl) 0,85 %, aquadest, Tris pH 8, aquabidest (ddH<sub>2</sub>O), buffer 1 x TE (Tris EDTA), SDS 10 %, proteinase K (10 mg/μl), phenol:chloroform (24:24), NaCOOH 3 M, isopropanol, etanol 70 %, agarose, buffer 1 x TBE (Tris-Boric-EDTA), Ethidium Bromide, 10 x BPB (Bromo Phenol Blue), primer, spritus, amonium sulfat 60%, safranin, iodin, kristal violet.



### 3.3 Prosedur dan Cara Kerja

#### 3.3.1 Fermentasi Kakao Hibrid (Trinitario)

Sampel kakao varietas hibrid di kupas. Bijinya dikeluarkan dari kulit, kemudian dibungkus dengan daun pisang yang sudah disterilkan. Dimpan di dalam toples yang telah dilubangi. Fermentasi selama 36 -48 jam pada suhu kamar.



**Gambar 6.** Skema kerja fermentasi Kakao

- a. Buah kakao varietas hibrida,
- b. Biji kakao di bungkus dengan daun pisang steril
- c. Biji d inkubasi didalam kotak yang telah dilubangi.

#### 3.3.2 Sterilisasi Alat yang Digunakan

Alat gelas dibungkus dengan aluminium foil, pipet mikro diletakan dalam wadahnya, ditutup rapat dan diberi selotip, tabung eppendof dimasukan kedalam beaker glass, lalu ditutup rapat dengan aluminium foil, kemudian disterilkan dalam autoclave pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 15 lb selama 60 menit. Jarum ose dan batang pengaduk disterilkan dengan membakarnya diatas api bunsen hingga membara, dibiarkan sebentar baru kemudian digunakan untuk setiap kali penggunaannya.

### 3.3.3 Persiapan dan Pembuatan Media

#### 1. Pembuatan medium MRS Broth (Merck)

Bubuk MRS broth (Merck) ditimbang 55,15 gram dalam erlenmeyer 250 mL, lalu dilarutkan dalam 200 mL aquades, kemudian dipanaskan sampai homogen dan disterilkan pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 15 lb selama 60 menit.

#### 2. Pembuatan media MRS Agar (Merck)

MRS broth (Merck) ditimbang 62,8 gram dalam erlenmeyer 250 mL lalu dilarutkan dalam 200 mL aquades, dipanaskan sampai homogen, kemudian disterilkan pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 15 lb selama 60 menit, selanjutnya dituang dalam cawan petri steril sebanyak 15 mL, lalu dibiarkan beberapa menit sampai medium membeku, kemudian disimpan dalam keadaan terbalik pada lemari pendingin.

#### 3. Pembuatan media Pepton Water

Pepton Water ditimbang 20 gram dalam erlenmeyer 250 mL dilarutkan dalam 200 mL aquadest, kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai benar-benar larut, kemudian dipindahkan ke dalam tabung eppendorf sebanyak 0,9 mL dan sterilkan pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 15 lb, selama 60 menit.

#### 4. Pembuatan media Nutrient Agar (Merck)

Nutrien Agar ditimbang 28 gram dalam erlenmeyer 250 mL, lalu dilarutkan dalam 200 mL aquadest, dipanaskan sampai homogen kemudian disterilkan pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 15 lb selama 60 menit, selanjutnya dituang dalam cawan



petri steril sebanyak 15 mL, lalu dibiarkan beberapa menit sampai medium membeku, kemudian disimpan dalam keadaan terbalik pada lemari pendingin.

#### 3.3.4 Isolasi BAL dari Fermentasi Kakao Varietas Hibrid dengan Metoda Konvensional

Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dimulai dengan proses pengkayaan (*enrichment*), yaitu 1 gram sampel dicampurkan kedalam 9 mL MRS Broth (Merk), lalu dihomogenkan sehingga didapatkan pengenceran 1 : 9 atau  $10^{-1}$  kemudian dimasukan kedalam jar anaerobik dan di inkubasi dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Setelah di inkubasi, sampel diencerkan menggunakan 0,9 mL *pepton water* yang berada di dalam tabung eppendorf melalui proses pengenceran (*serial dillution*) sampai  $10^{-7}$  dengan cara diambil 0,1 mL dari enrichment/ $10^{-1}$  lalu ditambahkan kedalam tabung eppendorf yang berisi 0,9 mL *pepton water* sehingga didapat pengenceran  $10^{-2}$ , diambil 0,1 mL dari pengenceran  $10^{-2}$  ditambahkan kedalam tabung eppendof yang berisi 0,9 mL *pepton water* sehingga didapatkan pengenceran  $10^{-3}$  dan seterusnya hingga didapatkan pengenceran  $10^{-7}$ . Kemudian di lanjutkan dengan proses penanaman (*planting*) dimana diambil 0,1 mL dari tabung eppendorf pada pengenceran  $10^{-7}$  lalu ditanamkan pada medium MRS agar (Merck), kemudian dimasukkan dalam jar anerobik dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. Koloni BAL tunggal yang tumbuh dipindahkan kembali ke dalam media MRS Agar (Merck) yang baru secara gores kemudian dimasukkan dalam desikator dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam untuk pemurnian dan identifikasi dengan pewarnaan gram (Syukur, 2005)

### 3.3.5 Identifikasi Morfologi BAL

Identifikasi morfologi BAL dilakukan dengan dua cara, yaitu identifikasi makroskopik dan mikroskopik. Identifikasi makroskopis yang diamati adalah bentuk, warna, tepian dan elevasi koloni BAL yang tumbuh pada medium MRS agar sedangkan identifikasi mikroskopik yaitu bentuk sel, dan identifikasi fisiologis dengan uji Gram (Unus, 2005).

Pewarnaan diawali dengan pengambilan bakteri tunggal dari medium dengan menggunakan ose didepan nyala bunsen yang kemudian dioleskan pada gelas preparat dan ratakan dengan gelas preparat dipermukaannya, lalu di keringkan pada udara bebas. Setelah kering ditetaskan kristal violet dan dibiarkan selama 30 detik, setelah itu dibilas dengan air mengalir dan selanjutnya ditetaskan logol selama 30 detik. Setelah dibilas kembali dengan air, kemudian dicuci dengan alkohol selama 10-20 detik dan dibilas kembali dengan air. Kemudian tetaskan safranin diatasnya dan biarkan selama 30 detik, setelah itu dibilas dengan air dan dikeringkan menggunakan kertas saring. Dengan mikroskop pada pembesaran 10 kali dapat dilihat hasil uji gram bakteri.

### 3.3.6 Uji Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba dilakukan terhadap empat bakteri uji yaitu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* dan *Pseudomonas sp.* Metoda yang digunakan adalah metoda cakram. Sebanyak 10 mL MRS Broth yang telah berisi koloni BAL diinkubasi pada suhu 37°C secara anaerob. Ditimbang 2, 4 gram NA dalam 120 mL aquades. Disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lb. Kemudian dituang kedalam petridish



sebanyak 15 mL, biarkan dingin. Setelah dingin dicelupkan kertas cakram steril kedalam MRS broth yang berisi koloni BAL, kertas cakram tersebut diangkat dan ditempelkan pada media NA padat yang telah berisi bakteri pathogen. Pengamatan dilakukan terhadap zona bening yang terbentuk pada jam ke-3, 24, 48, dan 72 jam (Mustopa, 2009)

### 3.3.7 Optimasi Pembentukan Bakteriosin

Pengujian optimasi pembentukan bakteriosin dilakukan pada beberapa variasi pH MRS borth yaitu pH 2-6. Diinkubasi semalam pada suhu 37°C. Kultur yang terbentuk kemudian disentrifuse dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Dilakukan uji antimikroba dengan metoda cakram seperti dijelaskan pada prosedur di atas (Mustopa, 2009).

### 3.3.8 Isolasi dan Penentuan Ukuran Molekul Bakteriosin dengan SDS-PAGE

Isolat yang unggul di kulturkan kedalam 100 mL MRS Broth, diinkubasi semalam dengan suhu 37°C. Kultur di sentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh ditambahkan 60 % ammonium sulfat sebanyak satu sendok setiap 5 menit sambil diaduk pada suhu 4°C sampai semua ammonium sulfat habis. Diamkan selama semalam dalam suhu 4°C agar bakteriosinnya mengendap. Disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. Diambil pelletnya, kemudian ditambahkan 1,5 ml Tris HCl pH 8,5. Campuran dipipet sebanyak 1,5 ml dan dimasukkan ke dalam membran dialisis. Dialisis semalam dalam buffer dialisis yang terdiri dari 100 mM NaCl, tris HCl pH 8,5 dan glyserin dengan perbandingan 8: 1 : 1. Bakteriosin yang sudah didialisis kemudian dipisahkan dengan *Sodium Dodecyl Sulphate*

*Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS PAGE) dengan marker yang berkisar antara 10 - 200 kD (Bio-Rad). Konsentrasi gel yang digunakan 10 % , berikut adalah reagen dan bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan gel poliacrilamid:

**Tabel 7:** Komposisi reagen untuk pembuatan Gel Polyacrylamida SDS-PAGE

Reagen	Running Gel 10%	Stacking Gel
30 % acrilamide	2 ml	284 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	1 ml	1 ml
Running Buffer (0,75 M Tris-HCl : 18,17 g/200 ml pH 8,8)	3 ml	-
Stacking Buffer (0,25 M Tris-HCl : 3,005 g/100 ml pH 7,0)	-	733 x 2 $\mu$ l
APS (Ammonium PerSulphat)	45,9 $\mu$ l	21,6 $\mu$ l
TEMED	10,2 ml	4,8 $\mu$ l

SDS PAGE dioperasikan selama 90 menit dengan voltase 40 mA. Gel diwarnai dengan *coomassie blue* dan digoyang semalam. Dilihat fragmen yang terbentuk dengan *scanner* komputer (Yekti, 2001)

### 3.3.9 Isolasi DNA Genomik Bakteri

Isolat BAL yang telah dikultur dalam medium cair MRS Broth kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus 2 mL steril dan disentrifuse dengan mikrosentrifus pada suhu 4°C selama 5 menit, dengan kecepatan 14.000 rpm. Supernatan dibuang, kemudian pelet sel yang diperoleh ditambahkan dengan 1 x TE sebanyak 500  $\mu$ L. Kemudian 50  $\mu$ L 10 % SDS dan 5  $\mu$ L proteinase K dicampurkan dan dibolak-balik. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dalam *water bath*. Ditambahkan Phenol : Cloroform (P:C = 1:1) sebanyak 600  $\mu$ l. Disentrifuse dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5menit. Dibuang pellet dan



ditransfer supernatant ke tube yang baru. Ditambahkan isopropanol sehingga volume akhirnya 70 % . Disimpan dalam  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit kemudian disentrifus pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Pelet DNA yang diperoleh di tambahkan dengan natrium asetat  $1/10 \mu\text{l}$  dari volume pellet dan  $6/10 \mu\text{L}$  isopropanol dari total volume yang ada, kemudian dibolak balikan tabung tersebut. Setelah itu disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit. Pellet DNA diambil kemudian dicuci dengan etanol 70% sebanyak  $1 \mu\text{L}$ . Dibuang etanol, dan dikeringanginkan tube hingga etanol benar-benar hilang dan terakhir ditambahkan  $25 \mu\text{L}$  buffer TE. DNA template disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  (Mustopa, 2009)

### 3.3.10 Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR

DNA diamplifikasi menggunakan PCR sebanyak 35 siklus. Primer yang digunakan :

27F : AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG      M = C / A

1525R : AAG GAG GTG WTC CAR CC      W = A / T

DNA template yang digunakan adalah  $3 \mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam tube. Bahan-bahan untuk satu sampel dalam reaksi PCR adalah  $19 \mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, primer F dan R masing-masing  $0,5 \mu\text{L}$  dan  $1 \mu\text{L}$  10 mM dNTPs, dan kit RTG yang berisi Taq polymerase dan dNTP sebanyak  $45 \mu\text{L}$ . Bahan di atas ditambahkan ke dalam tube DNA template. Protokol PCR adalah sebanyak 35 siklus PCR (denaturasi  $96^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit, denaturasi berikutnya  $96^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, annealing  $55^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, ekstensi  $72^{\circ}\text{C}$  selama 3 menit dan final extension  $72^{\circ}\text{C}$  selama 7 menit). Produk PCR dianalisa dengan elektroforesis (Mustopa, 2009)

### 3.3.11 Gel elektroforesis.

Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  produk PCR ditambah dengan 4  $\mu\text{L}$  loading dye dielektroforesis pada 100 V selama 45 menit pada 1 % agarose gel dalam 0.5 x TBE. Sebagai marker digunakan DNA- $\lambda$  100 ng/ $\mu\text{L}$ . Gel kemudian diletakkan di dalam wadah ditambah dengan TBE sampai terendam kemudia ditambah dengan ethidium bromide direndam sambil digoyang selama 30 menit. Gel kemudian dilihat di bawah lampu UV (Mustopa, 2009)

### 3.3.12 Sekuensing DNA

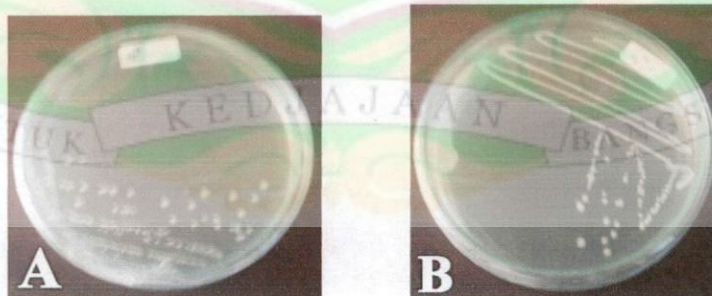
Sampel yang telah dipurifikasi dikirim ke Macrogen Korea untuk penentuan sekuen nukleotidanya. Sekuen data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan program BLAST. Sekuen dibandingkan dengan *database* yang terdapat pada situs NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) menggunakan program BLAST. Sekuen *alignments* dilakukan dengan menggunakan the ClustalW 1.83.



## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Fermentasi Kakao Varietas Hibrid

Isolasi BAL dari fermentasi kakao hibrid dimulai dengan proses pengkayaan (*enrichment*) pada media MRS broth selama 24 jam. Hal ini bertujuan agar BAL yang diharapkan tumbuh cepat dan berkembang biak lebih banyak karena MRS broth mempunyai nilai pH optimum untuk pertumbuhan BAL. Selanjutnya dilakukan pengenceran menggunakan *pepton water* hingga  $10^{-7}$ . Tujuannya agar bakteri yang tumbuh berkoloni-koloni, tidak menumpuk sehingga memudahkan dalam mendapatkan isolat. Terakhir adalah penanaman pada media MRS agar selama 48 jam dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Isolasi yang dilakukan memberikan 8 isolat, yaitu H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 dan H8. Koloni tunggal pada semua isolat yang didapat diidentifikasi secara makroskopik. Hasil yang didapat memperlihatkan ciri yang sama, yaitu bentuk bulat kecil, bewarna putih, mengkilat, tepi koloni licin dan sedikit cembung.



**Gambar 7.** Isolat BAL pada media MRS Agar (A = Isolat H2, B= isolat H5)

Koloni bakteri juga di amati jumlahnya dengan menggunakan alat koloni counter.

**Tabel 8.** Jumlah total koloni dalam satuan cfu/mL dengan menggunakan koloni counter

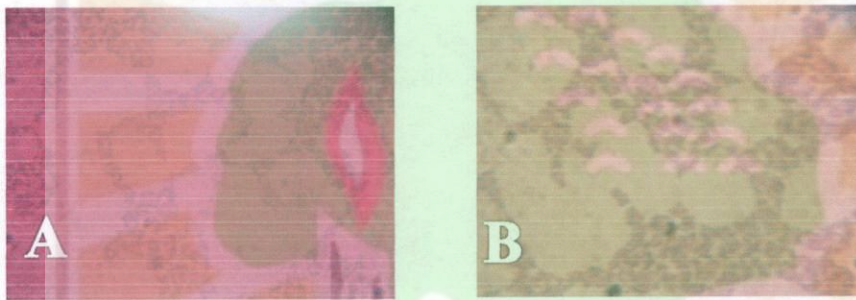
<b>Isolat</b>	<b>Jumlah Koloni CFU/mL</b>
H1	50 X 10 <sup>9</sup>
H2	33 X 10 <sup>9</sup>
H3	20 X 10 <sup>9</sup>
H4	62 X 10 <sup>9</sup>
H5	68 X 10 <sup>9</sup>
H6	21 X 10 <sup>9</sup>
H7	45 X 10 <sup>9</sup>
H8	32 X 10 <sup>9</sup>

Selain secara makroskopik, pengujian juga dilanjutkan secara mikroskopik dengan pewarnaan gram. Hasil uji yang dilakukan memperlihatkan bahwa ke-8 isolat BAL tergolong kepada bakteri gram positif berbentuk kokus dengan warna ungu. Unus (2005) menyatakan bahwa, warna ungu yang diserap oleh bakteri disebabkan karena pada saat pemberian kristal violet, sel masih bewarna biru, setelah dicuci dengan alkohol sel mengalami dehidrasi, pori-pori berkerut, permeabilitas menurun, kompleks kristal violet tidak dapat keluar. Kemudian pada penambahan safranin sel tidak berpengaruh, sehingga sel tetap bewarna biru. Sedangkan pada gram negatif saat pencucian dengan alkohol lemak tereksitasi dari dinding sel, pori-pori membesar, kompleks kristal violet tercuci keluar, sel menjadi tidak bewarna. Saat penambahan safranin sel menyerap zat warna sehingga sel bewarna merah.

Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang lebih tebal dari gram negatif. Ketebalannya berkisar 20-80 nm dan mengandung hampir 90% peptidoglikan.



Peptidoglikan inilah yang menyerap kristal violet sehingga zat warna tidak dapat keluar dari dinding sel sehingga pada saat pemberian pewarna safranin tidak memberikan pengaruh. Sedangkan bakteri gram negatif dinding selnya tipis, hanya mengandung 20-50% peptidoglikan sehingga akan lebih mudah mengalami lisis terhadap senyawa-senyawa antimikroba yang diberikan. Semua Isolat memperlihatkan bentuk sel kokus, gram positif.



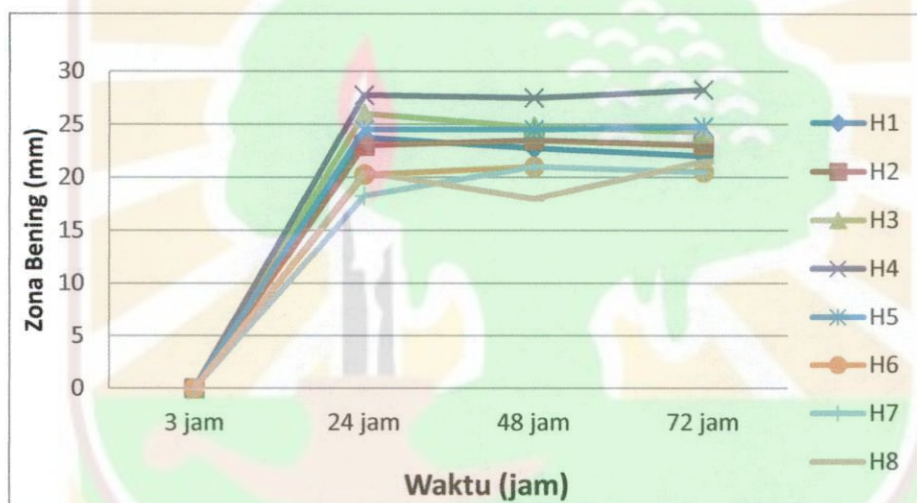
**Gambar 8.** Hasil pewarnaan gram BAL (A = Isolat H2, B = Isolat H5)

#### 4.2 Uji Antimikroba

Uji ini dilakukan dengan tujuan melihat aktivitas antimikroba dari isolat BAL yang diperoleh dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Dalam uji ini bakteri patogen yang digunakan adalah *Escherechia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, dan *Pseudomonas sp* yang merupakan koleksi dari STIKES Padang.

Uji aktivitas antimikroba dilakukan terhadap 8 isolat yang diperoleh yaitu, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, dan H8. Gambar 9 memperlihatkan bahwa isolat H3

dan H4 memperlihatkan aktivitas antimikroba yang tinggi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan isolat yang lain. Isolat H4 pada pengamatan 24 jam diameter zona hambatnya mencapai 27.75 mm setelah 48 jam menjadi 27.5 mm. Pengamatan pada 72 jam memperlihatkan diameter isolat H4 sebesar 28.25 mm. Sedangkan isolat H3, pada pengamatan 24 jam zona hambat sebesar 26 mm, pada jam ke 48 menjadi 24.75 mm. Pengamatan terakhir pada 72 jam, aktivitas zona hambatnya sebesar 24.25 mm.

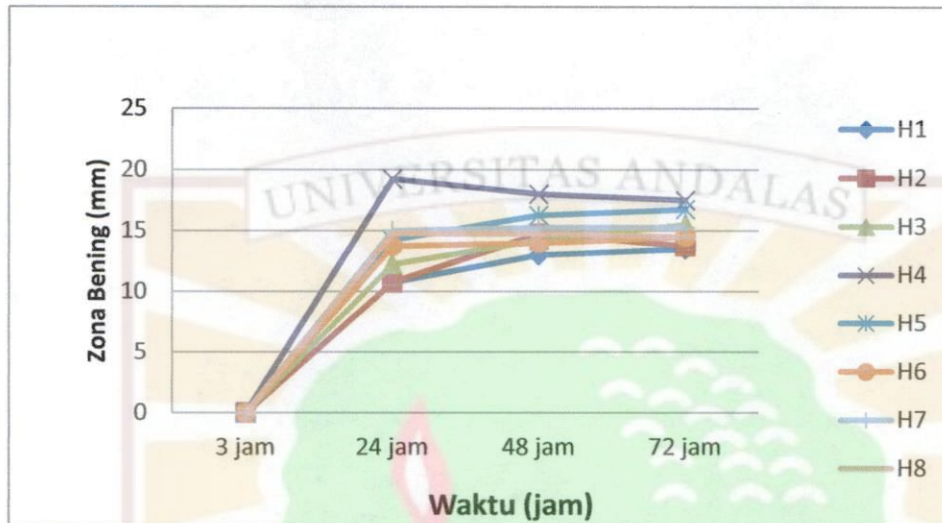


**Gambar 9.** Grafik hasil pengamatan zona hambat ke-8 isolat BAL terhadap *Staphylococcus aureus*

Pengamatan aktivitas antimikroba dilanjutkan pada bakteri *E.coli*. Pada Gambar 10 dapat dilihat, isolat H4 pada jam ke-24 menunjukkan zona hambat sebesar 19.25 mm, kemudian pada jam ke-48 turun menjadi 18 mm, pada jam ke 72 aktivitas menurun menjadi 17.5 mm. Hal ini disebabkan karena pada jam ke-48 BAL

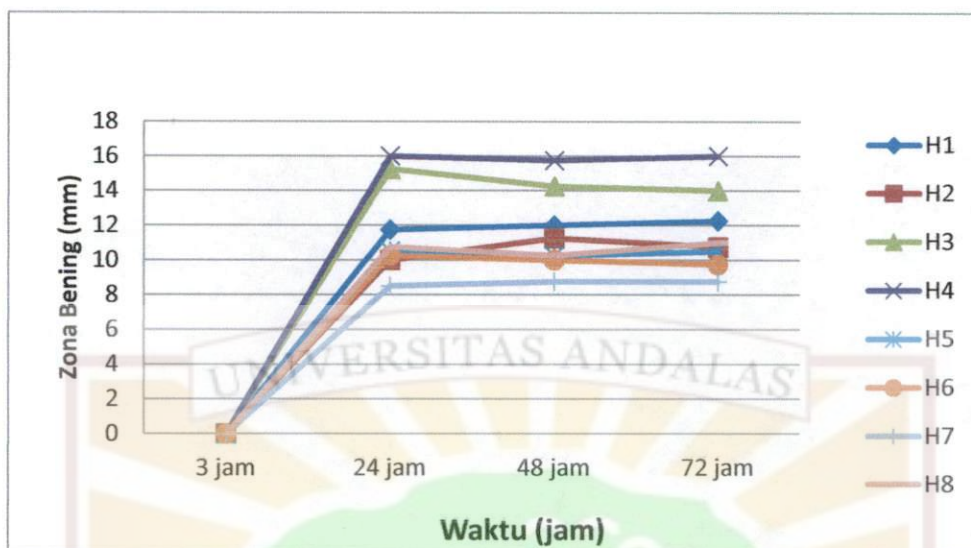


mengalami fase stasioner sedangkan pada jam ke-72 BAL mengalami fase menuju kematian.

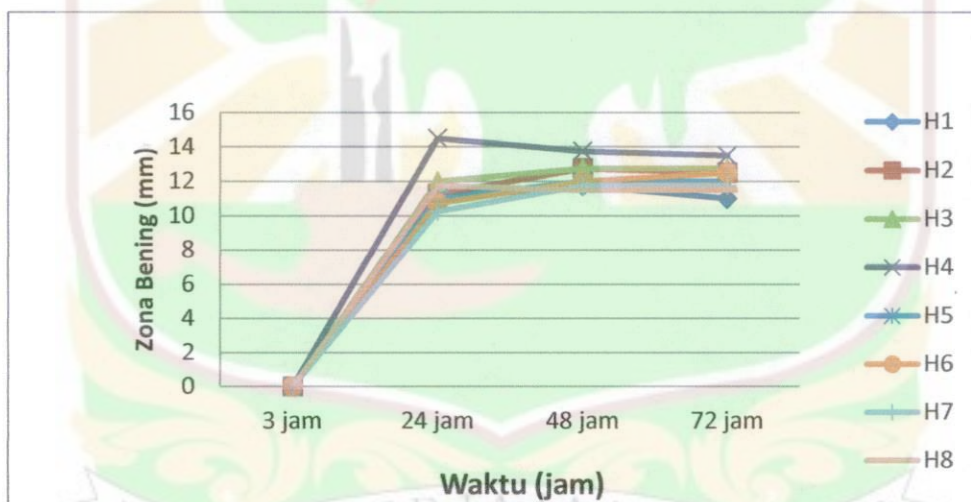


**Gambar 10.** Hasil Pengamatan Zona Hambat ke-8 isolat BAL terhadap Bakteri *Escherichia Coli*

Pada Gambar 11 memperlihatkan aktivitas zona hambat ke-8 isolat terhadap bakteri *Streptococcus sp.* Isolat H4 tetap memperlihatkan zona hambat paling tinggi dibandingkan dengan isolate lainnya. Zona hambat H4 pada 24 jam pertama sebesar 16 mm, jam ke-48 turun menjadi 15.75 mm, namun pada jam ke-72 aktivitas kembali meningkat menjadi 16 mm. Selain isolat H4, isolat H3 juga memiliki aktivitas zona hambat yang besar. Pengamatan pada 24 jam pertama aktivitas zona hambatnya sebesar 15.25 mm, jam ke-48 menjadi 14.25, kemudian pada jam ke 72 sebesar 14 mm.



**Gambar 11.** Hasil pengamatan zona hambat ke-8 isolat BAL terhadap bakteri *Streptococcus sp.*

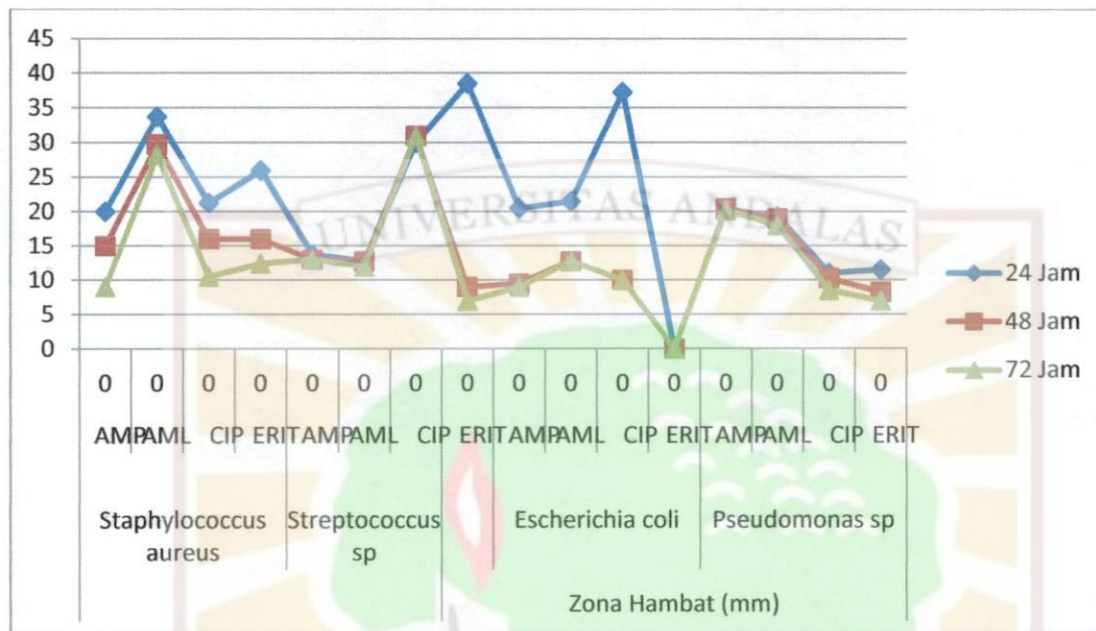


**Gambar 12.** Hasil pengamatan zona hambat ke-8 isolat BAL terhadap bakteri *Pseudomonas sp.*

Gambar 12 memperlihatkan hasil pengamatan aktivitas antimikroba ke-8 isolat terhadap bakteri *Pseudomonas sp.* Isolat H4 memperlihatkan zona hambat paling tinggi dari semua isolat yang ada. Pengamatan 24 jam pertama



memperlihatkan zona hambat yang dihasilkan sebesar 14.5 mm, pada jam ke-48 sebesar 13.75 mm, kemudian pada jam ke-72 turun menjadi 11.5 mm.



**Gambar 13.** Hasil pengamatan zona hambat antibiotik terhadap ke-4 bakteri patogen

Pada Gambar 13 memperlihatkan bahwa ke-4 jenis antibiotik, yaitu ampisilin, amoxilin, ciproflosasin dan eritromisin dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen mulai dari jam ke-24 sampai jam ke-72. Meskipun daya hambat ke-4 antibiotik ini tinggi dibandingkan dengan isolat H1-H8, namun pada jam ke 72 antibiotik sudah mulai memperlihatkan ketidak keresistennannya terhadap ke-4 bakteri patogen tersebut. Karena di sekitar zona bening yang dihasilkan telah tumbuh bakteri patogen. Hal ini membuktikan bahwa antibiotik lemah terhadap *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *Escherechia coli* dan *Pseudomonas sp*. pada jam ke-72.

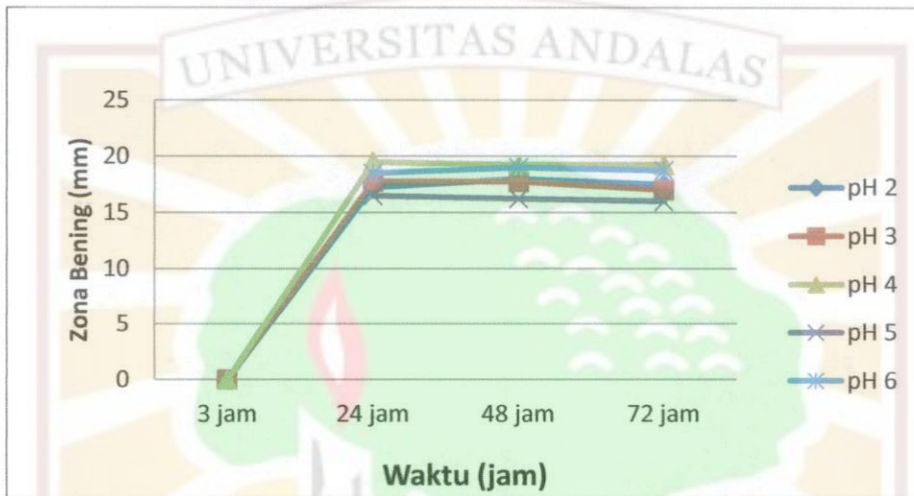
Dari semua uji antimikroba yang dilakukan pada ke-8 isolat BAL yang diisolasi dari hasil fermentasi kakao varietas hibrid menyatakan bahwa, seluruh isolat memiliki kemampuan untuk menghambat ke-4 jenis bakteri pathogen, yaitu *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* dan *Pseudomonas sp.* Namun yang menunjukkan aktivitas tertinggi adalah H2, H3 dan H4 dalam melawan bakteri patogen jenis *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus sp.* Hal ini disebabkan karena bakteriosin yang berperan sebagai antimikroba yang terkandung di dalam BAL yang mampu melawan bakteri patogen. Perbedaan zona hambat masing-masing isolat di setiap variasi waktu tidak memperlihatkan pengaruh yang signifikan, yaitu antara waktu pengamatan 48 jam dan 72 jam. Hal ini menyatakan bahwa ke-3 isolat tersebut resisten terhadap ke dua bakteri patogen yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus sp.* Sedangkan untuk ke-4 jenis antibiotik, dapat dikatakan memiliki kemampuan menghambat bakteri patogen, namun tidak sekuat isolat H2, H3 dan H4 yang hingga jam ke-72 tidak ditumbuhi bakteri patogen disekitar zona bening. Dengan demikian isolat terpilih tersebut, selain dapat diaplikasikan sebagai suplemen probiotik yang dapat mempertahankan mikroflora usus dengan baik juga sebagai antibiotik dalam mengobati penyakit kulit dan infeksi pada saluran pernafasan.

#### **4.3 Optimasi Pembentukan Bakteriosin**

Dari hasil uji antimikroba, isolat yang terpilih adalah H2, H3 dan H4 ditumbuhkan pada media MRS broth dengan variasi pH 2, 3, 4, 5 dan 6. Hal ini bertujuan untuk mengoptimalkan pertumbuhan bakteri sehingga menghasilkan

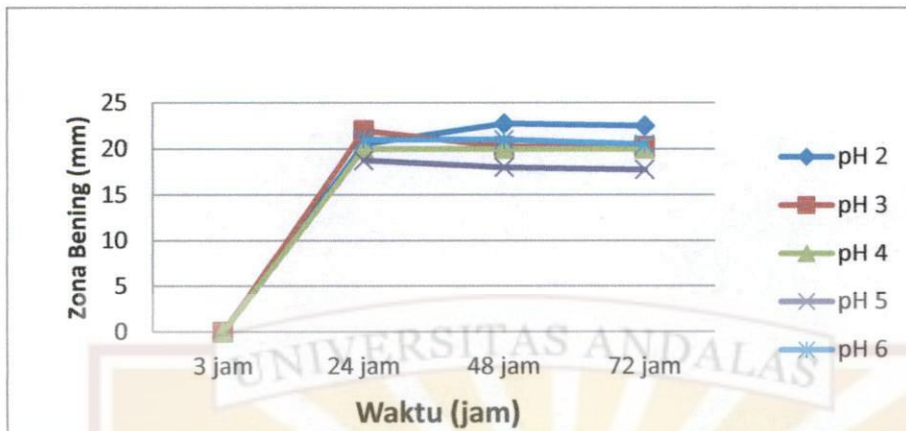


bakteriosin yang lebih banyak serta melihat pada range pH mana bakteri tersebut mampu menghasilkan bakteriosin yang mampu menghambat bakteri patogen yang ditandai dengan semakin besarnya zona hambat yang dihasilkan ke-3 isolat terpilih. Bakteri uji yang dipilih adalah *Streptococcus sp.* dan *Staphylococcus aureus*.



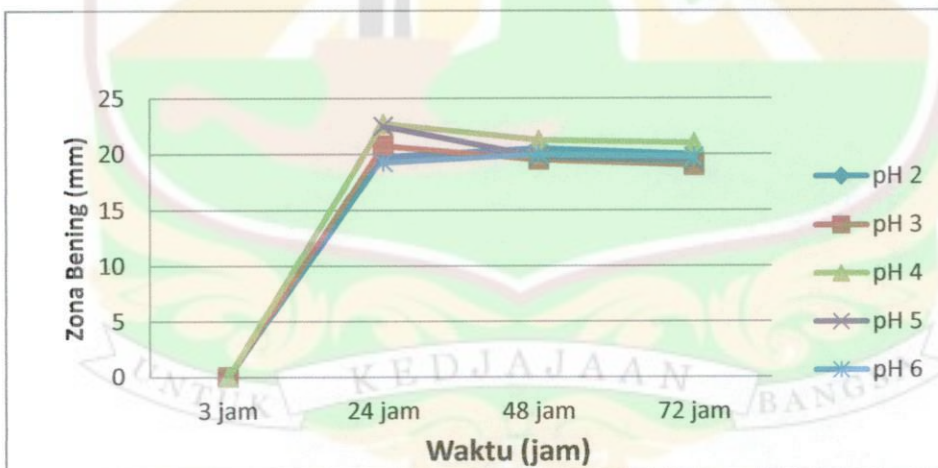
**Gambar 14.** Grafik Hasil Pengamatan Zona Hambat isolate H2 terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Dari Gambar 14 dapat dilihat bahwa isolat H2 memiliki zona hambat yang besar pada pH 4. Hal tersebut dapat dilihat pada jam ke 24 sebesar 19,5 mm, pada 48 jam turun menjadi 19.25 mm hingga jam ke-72 zona hambat masih dalam kondisi stabil.



**Gambar 15.** Grafik hasil pengamatan zona hambat isolat H3 terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

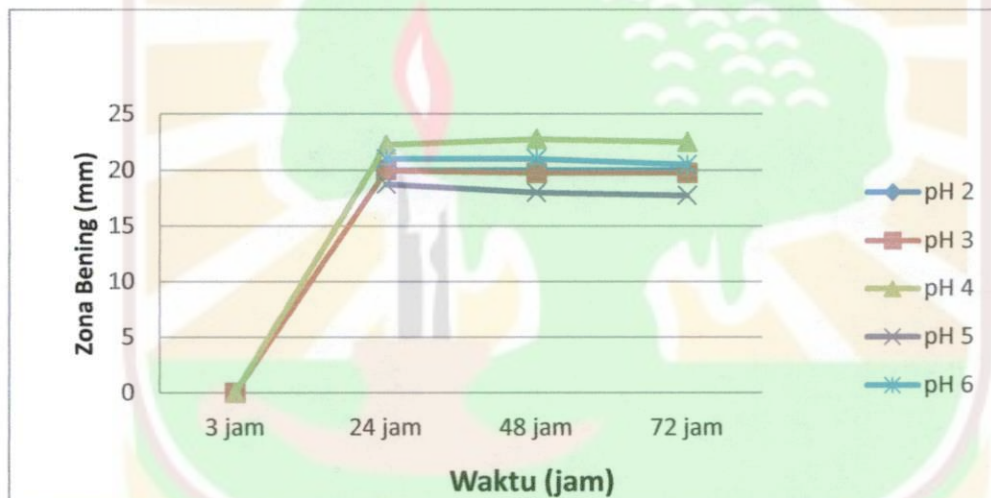
Pengamatan pada Gambar 15 memperlihatkan bahwa pada pH 2 isolat H3 memperlihatkan aktivitas zona hambat paling tinggi dibandingkan dengan pH lainnya. Pada jam ke-24 zona hambatnya 20.5 mm, jam ke-48 sebesar 22.75 mm dan pada jam ke-72 turun menjadi 22.5 mm.



**Gambar 16.** Grafik hasil pengamatan zona hambat isolat H4 terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

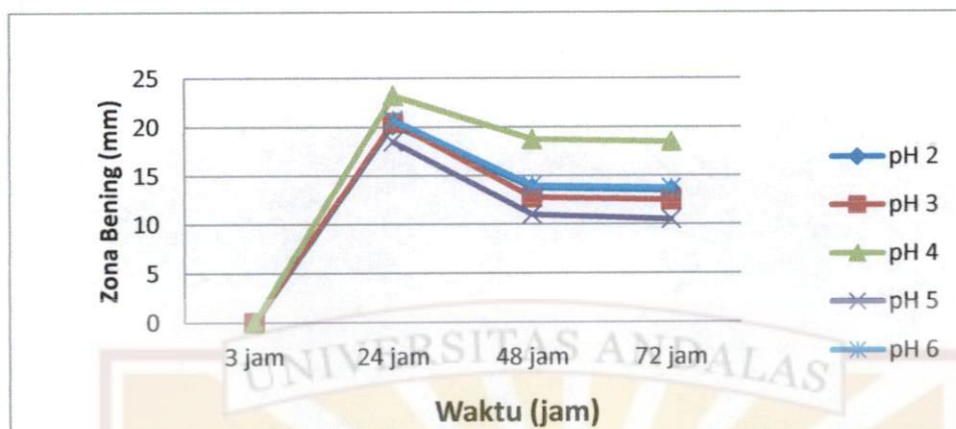


Gambar 16 memperlihatkan bahwa aktivitas zona hambat H4 pada pH 4 lebih tinggi dibandingkan dengan pH yang lainnya. Pada pengamatan 24 jam zona hambatnya 22.75 mm. Jam ke-48 sebesar 19.5 mm dan pengamatan jam ke 72 turun menjadi 21 mm. Meskipun aktivitas zona hambat H4 pada pH 4 turun mulai jam ke 48 hingga jam ke 72 namun masih memperlihatkan bahwa isolat H4 aktivitas zona hambatnya tetap lebih tinggi bila dibandingkan dengan pH lainnya. Dari data diatas dapat disimpulkan bahwa isolat H4 memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yang kuat pada pH 4.



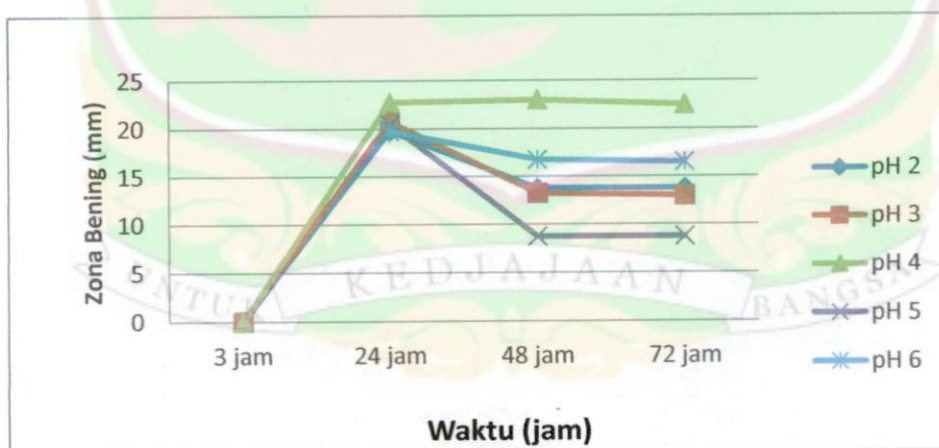
**Gambar 17.** Grafik hasil pengamatan zona hambat isolat H2 terhadap bakteri *Streptococcus sp.*

Data pada Gambar 17 memperlihatkan bahwa isolate H4 pada pH 4 menunjukkan zona hambat paling tinggi dari yang lain. Pengamatan pada jam ke-24 zona hambat yang dihasilkan adalah 22.5 mm, jam ke-48 sebesar 22.75 mm dan jam ke-72 menjadi 22.5 mm.



**Gambar 18.** Grafik hasil pengamatan zona hambat isolat H3 terhadap bakteri *Streptococcus sp.*

Gambar 18 memperlihatkan bahwa isolat H3 pada pH 4 juga menunjukkan zona hambat yang paling tinggi dari kondisi pH yang lain. Pada 24 jam pertama zona hambatnya sebesar 23.25 mm, kemudian pada jam ke 48 adalah 18.75 mm dan pada jam ke-72 sebesar 18.5 mm. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan isolat H4 menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus sp.* berada pada pH 4.



**Gambar 19.** Grafik hasil pengamatan zona hambat isolat H4 terhadap bakteri *Streptococcus sp.*

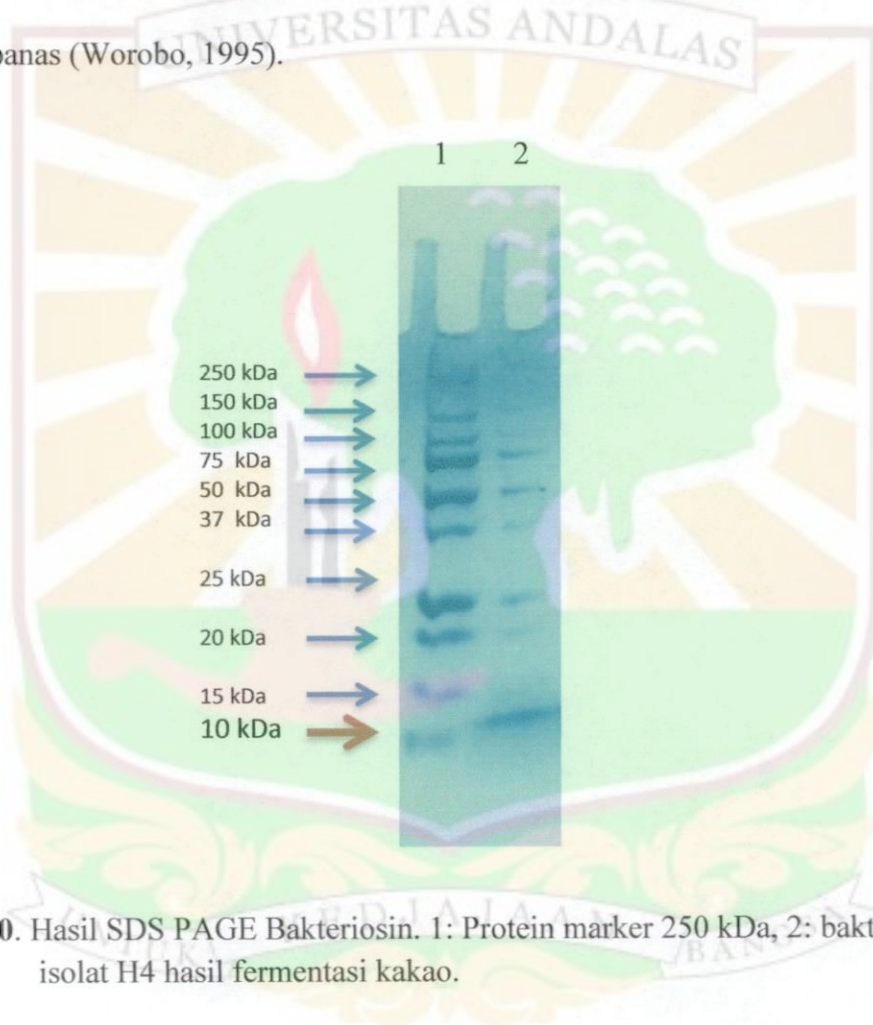


Isolat H4 pada pH 4 memperlihatkan zona hambat paling tinggi pada Jam ke-24 zona hambatnya sebesar 22.75 mm, pada jam ke-8 adalah 23 mm dan pada jam ke 72 menunjukkan angka 22.5 mm.

Hasil yang diperoleh memperlihatkan bahwa isolat H4 memiliki potensi yang besar dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Pseudomonas sp.* dan *Streptococcus sp.* yang terlihat dari uji antimikroba. Isolat H4 memperlihatkan zona bening paling besar dibandingkan dengan isolat yang lain. Sedangkan untuk uji optimasi pembentukan bakteriosin isolat H4 masih juga mengungguli dalam penghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus sp.* pada pH4. Perubahan besar zona hambat pada jam ke-24 menuju 48 disebabkan karena BAL mengekskresikan bakteriosin pada fase pertumbuhan logaritma, namun pada fase ini bakteriosin yang dikeluarkan masih dalam jumlah yang tidak terlalu besar. Namun pada jam ke-48, BAL memproduksi bakteriosin dalam jumlah yang meningkat. Sedangkan pada jam ke-72 tidak memperlihatkan perubahan yang signifikan. Hal ini disebabkan karena BAL berada pada fase stasioner, yaitu fase dimana konsentrasi nutrisi untuk BAL semakin berkurang yang disebabkan jumlah medium yang digunakan terus menerus untuk pertumbuhan sel sehingga pertumbuhan sel menjadi lambat yang berdampak pada berkurangnya produksi bakteriosin.

#### 4.4. Isolasi dan Penentuan Berat Molekul Bakteriosin

Hasil isolasi dan penentuan berat molekul bakteriosin memperlihatkan bahwa ukuran bakteriosin yang diperoleh dari isolat H4 pada pH 4 adalah sebesar 10 kDa setara dengan protein marker, seperti pada Gambar 20. Data yang diperoleh, isolat H4 tergolong kepada bakteriosin kelas II yang merupakan peptida berat rendah dan tahan panas (Worobo, 1995).



**Gambar 20.** Hasil SDS PAGE Bakteriosin. 1: Protein marker 250 kDa, 2: bakteriosin isolat H4 hasil fermentasi kakao.

Bakteriosin gram positif merupakan senyawa aktif membran yang bekerja melalui pembentukan pori pada membran sel target. Pembentukan pori pada



membrane sel merangsang permeabilitas membran yang dapat mengganggu keseimbangan ADP/ATP intraseluler akibat kebocoran fosfat anorganik dan mengurangi daya gerak proton. Daya gerak proton (*Proton Motive Force* = PMF) merupakan gradien elektrokimia sitoplasma yang mengatur sintesis dan penimbunan ATP. Kegagalan PMF ini menyebabkan kematian sel melalui penghentian semua reaksi yang membutuhkan energi (Gajic, 2003). Efek tersebut menyebabkan pertumbuhan sel terhambat dan menghasilkan proses kematian pada sel yang sensitif terhadap bakteriosin.

Bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL ini tidak hanya bakteriostatik yaitu menghambat pertumbuhan bakteri jahat tapi juga bersifat bakterisidal yang dapat membunuh bakteri jahat bukan hanya menghambat sebagai akibat hilangnya kemampuan potensi membran. Oleh sebab itu bakteriosin yang dihasilkan mempunyai sifat sebagai antibiotik karena mempunyai sifat sebagai antimikroba terhadap bakteri patogen.

#### **4.5 Isolasi DNA Genomik Bakteri**

Isolasi DNA dilakukan dengan 4 langkah penting, yaitu menumbuhkan kultur bakteri semalam. Kemudian sel dilisis untuk membebaskan isinya dengan SDS dan EDTA. Pada sampel, bukan hanya DNA yang terdapat namun masih ada protein dan RNA dalam jumlah yang cukup besar. Untuk menghilangkannya menggunakan phenol : chloroform (PC) agar protein terpresipitasi. Lapisan DNA yang diperoleh diberi isopropanol untuk memekatkannya.

DNA yang diperoleh di elektroforesis untuk memastikan bahwa isolasi DNA yang dilakukan mendapatkan produk seperti pada Gambar 21.



**Gambar 21.** Produk DNA dilihat dengan elektroforesis  
(1 = DNA- $\lambda$  100 ng/L, 2 = produk DNA)

DNA- $\lambda$  merupakan DNA yang telah ditentukan konsentrasinya. Dengan menggunakan *dna- $\lambda$*  dapat diketahui konsentrasi dari DNA bakteri yang didapatkan. Ukuran DNA bakteri yang diperoleh setelah dibandingkan dengan DNA- $\lambda$  adalah sebesar 50 ng/L. Maka dapat dilanjutkan untuk amplifikasi Gen 16S rRNA untuk mendapatkan ukuran fragmen dari produk DNA yang kita isolasi.

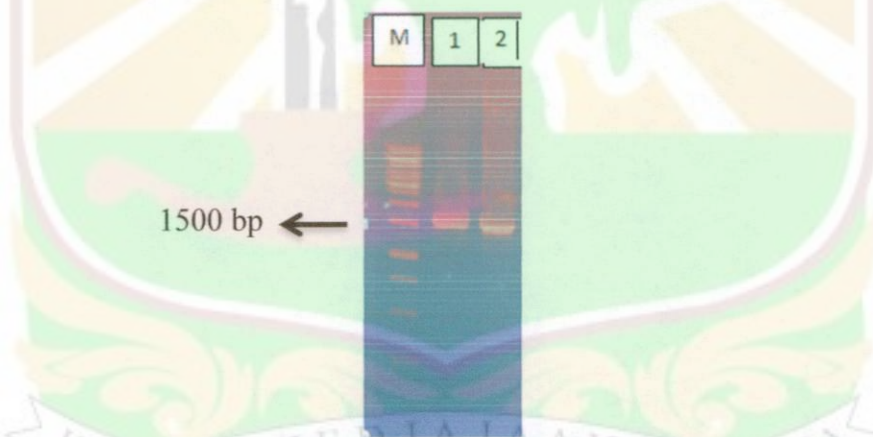
#### 4.6 Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan PCR

DNA hasil isolasi selanjutnya digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Proses amplifikasi



menggunakan primer *universal* yaitu 27F dan 1525R. Sekuen primer tersebut dapat terlihat pada bahan dan metoda.

Hasil amplifikasi gen 16S rRNA dengan teknik PCR terhadap template DNA isolat H4 dari kakao hibrid (*Trinitario*) menggunakan primer *universal* tersebut, menghasilkan produk DNA dengan ukuran sebesar 1500 bp. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 22 dengan munculnya fragmen produk PCR setara dengan 1500 bp pada marker DNA 1 kb. Fragmen yang terlihat sangat jelas dan tebal. Volume produk yang digunakan sebesar 25  $\mu$ L. Pada gambar terlihat ada *smear* yang merupakan kotoran-kotoran dari ekstrak DNA yang berupa protein atau RNA. Kotoran tersebut dapat terpisah dari DNA karena adanya perbedaan berat molekul antara DNA dengan protein.



**Gambar 22.** Visualisasi produk amplifikasi dengan PCR DNA isolat BAL terpilih H4. Lane M = DNA Marker 1 kb (Takara), Lane 1 dan 3 = Sampel H4

#### 4.7 Analisis Sekuen Gen 16S rRNA Isolat H4

Dari hasil sekuen DNA yang dilakukan secara satu arah menggunakan primer *universal* 1525R yang sama saat amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR didapatkan sekuen basa nukleotida yaitu 509 bp. Urutan basa-basa yang tersebut dianalisis dengan data GenBank melalui program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

**Tabel 9.** Hasil analisis sekuen isolat H4 dengan menggunakan BLAST

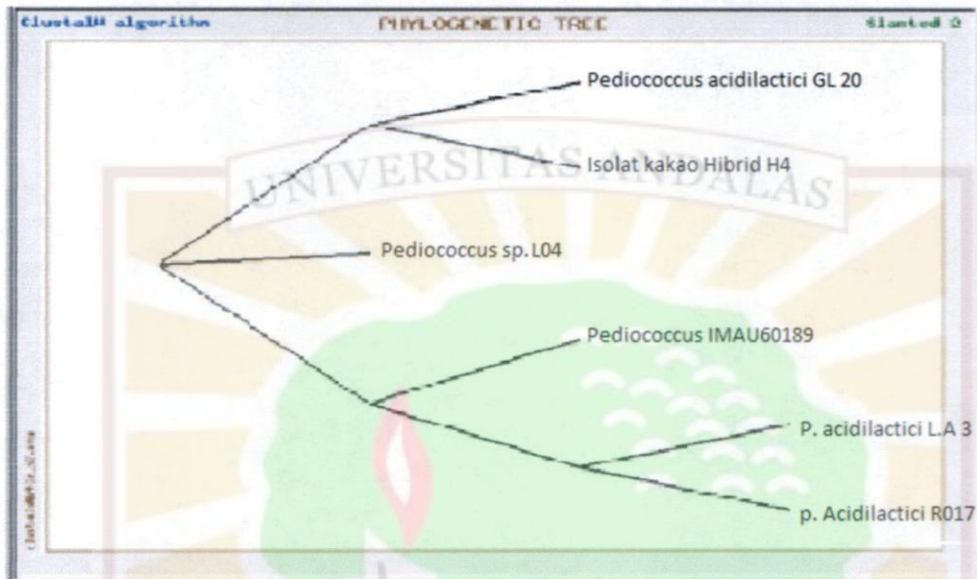
Accession	Blast search result	Query coverage	Evalue	Max ident
GO 421480.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> GL20	94%	1e-334	89%
AF 515229.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> R017	94%	1e-133	89%
AB 018213.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> LA3	94%	2e-137	89%
FJ 917739.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> IMAU60189	94%	3e-134	89%
AB 219053.1	<i>Pediococcus sp</i> L04	94%	3e-134	89%

Hasil BLAST memperlihatkan bahwa isolat H4 memiliki nilai query coverage yang sama sebesar 94% dan nilai identifikasi 89% dengan berbagai strain *Pediococcus acidilactici*, seperti yang terlihat pada Tabel 9.

Hasil pensejajaran basa-basa nitrogen, isolat H4 dengan *Pediococcus acidilactici* GL 20 pada database GenBank memperlihatkan jumlah basa nitrogen yang homolog yaitu 413 bp dan 96 basa yang tidak homolog (Lampiran 19). Ketidak homologian disebabkan karena adanya insersi, delesi dan insersi/delesi yang dapat disebabkan oleh mutasi gen karena faktor lingkungan. Setelah dianalisis menggunakan clustalW memperlihatkan kesamaan dengan *Pediococcus acidilactici*



GL 20. *P. acidilactici* termasuk family *Lactobacillaciae* yang merupakan salah satu dari bakteri asam laktat (BAL).



**Gambar 23.** Pohon filogenetik isolat H4 dengan ClustalW

*P. acidilactici* merupakan bakteri yang tahan terhadap pH rendah sehingga dapat mempertahankan mikroflora dalam saluran pencernaan. Sehingga disebut juga sebagai bakteri probiotik, yaitu bakteri yang menguntungkan bagi manusia yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen melalui produk asam laktat dan bakteriosin (Barros dkk, 2001). Menurut Dalloul dkk (2006) bahwa *P. acidilactici* memiliki efek beracun terhadap patogen parasit sehingga dapat digunakan sebagai obat alternatif pada ayam yang terinfeksi patogen tersebut. Selain itu, *P. acidilactici* juga bisa sebagai modulator kekebalan tubuh terhadap penyakit menular seperti penyakit yang dialami oleh anjing yaitu coccidiosis (Lee dkk, 2007). Sifat

patogenitas yang dimiliki oleh bakteri *P.acidilactici* disebabkan karena produk bakteriosin yang dihasilkannya, yang dikenal dengan *Pediocin* (Barros, 2001).





## V. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil isolasi dan penentuan berat molekul bakteriosin menyatakan bahwa isolat H4 diperkirakan memiliki ukuran berat molekul bakteriosin sebesar 10 kDa yang tergolong kepada kelompok bakteriosin kelas II.
2. Isolat BAL H4 yang diperoleh dari fermentasi kakao hibrid mempunyai zona bening tertinggi dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *E.coli* dan *Pseudomonas sp*.
3. Kondisi pH optimum bagi isolat H4 dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus sp*. yang ditunjukkan dengan zona bening tertinggi adalah pada pH 4.
4. Isolat H4 yang diperoleh disamping bersifat sebagai probiotik, juga dapat bersifat sebagai antibiotik karena menghasilkan bakteriosin yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen.
5. Isolat bakteri H4 dari fermentasi kakao varietas hibrid (*Trinitario*) mempunyai kemiripan 89% dengan *Pediococcus acidilactici* GL 20.

### 5.2. Saran

1. Perlu dilakukan pemurnian bakteriosin dengan kromatografi kolom.
2. Untuk mendapatkan informasi identitas genetik secara lebih akurat maka dalam analisis BLAST disarankan menggunakan entry data sekuen yang lebih panjang.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E., Liviawaty. E, dan Rostini. I. 2006. *Pemanfaatan Limbah Sayuran untuk Memproduksi Biomasa Lactobacillus plantarum sebagai Bahan Edible Coating dalam Meningkatkan Masa Simpan Ikan Segar dan Olahan*. Laporan Akhir. Unpad. 113 hlm.
- Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Hasil Pertanian. 1990. *Pembuatan Nata de Coco*. BBIHO. Bogor
- Buckle, K.A., Edwards, R.A. G.H. Fleet, and M. Wooton. 1987. *Ilmu Pangan*. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 365 hlm.
- Baron, C. dan Zambryski. P. C. 1995. *Notes from the Underground: Highlights from Plant-Microbe Interaction*. Tibtech. 13 : 356-361.
- Barros R.R., Carvalho G.S., Peralta J.M., Facklam R.R., Teixeira L.M. 2001. *Phenotypic and genotypic characterization of Pediococcus strains isolated from human clinical sources*. *J. Clin Microbiol.* April; 39(4): 1241-1246.
- Carl E. H, Margarita., D. O. dan Christine B. 1998. *Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation*. *J Sci Food Agric*: 77, 273-281.
- Cleveland, J., Monville, T.J., Ness, I. F., Chikindas. M.L. 2001. *Bacteriocins: safe natural antimicrobials for food preservation*. *Intern. J. Food Microbiol.* 71: 1-20.
- Suryani, Dinie, Zulfebriansyah, 2007. *Komoditas Kakao : Potret dan Peluang*.
- Cai. H., Archambault. Marie, dan Prescott. J, 2003, *16S rRNA Sequence Based Identification of Veterinary Clinical Bacteria*. *Journal Vet Diagnostic Investigation*. 15: 465-469.



- Christanto. A., Soepomo. S. 2000. *Uji Molekuler (Polymerase Chain Reaction)npada Otitis Media Supuratif Kronik Benigna Aktif*. Departemen THT-KL, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada/RS Dr Sardjito. Yogyakarta.pdf.
- Dalloul R.A., Lillehoj H.S, Lee J.S., Lee S.H., Chung K.S. 2006. *Immunopotentiating effect of a Fomitella fraxinea – derived lectin on chicken immunity and resistance to coccidiosis*. Poult. Sci. 85: 446S-451S
- Fleet. H. G. 2003. *The Microbial Ecology of Cocoa Bean fermentasi in Indonesia*. Food Science and Technology, School of Chemical Science. University of New South Wales, Sydney. Australia.
- Fuller, R. (1992). *Probiotik and Scientific Basis*. Chapman and hall,London.
- Goldin, B.R. 1998. *Health benefits of Probiotics*. British J. Nutr.80. Suppl. 2, S231-S233.
- Haryanto, R. *Antara Antibiotik, Probiotik dan Prebiotik*. Asisten mobil lab Basic Science Center ITB, Bandung. 2005.
- Jack, R.W., Tagg. J.R.dan Ray. B. 1995. *Bacteriocins of Gram-positive bacteria*. Microbi. Rev. 59 (2): 171-200.
- Jamsari. 2007. *Bioteknologi Pemula Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler*. Unri Press. Riau.
- Kandler, O dan Weiss, N. 1986. *Regular, non sporing ram-Positive rods*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (P.H.A. sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, dan J.G. Holts, eds). Williams dan Wilkins, Baltimore, pp. 1208-1234.

- Kim, H, dan Keeney, P. G. 1983. *Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47. 3693-3701.
- Lee SH, Lillehoj HS, Park DW, Hong YH, and Lin JJ. 2007. *Effects of Pediococcus –and Saccharomyces -based probiotic (MitoMax) on coccidiosis in broiler chickens. Comparative Immuno Microbiol & Infectious disease*. 30:261-268
- Martirani, L., Varcamonti. M.G. Naclerio and Felice. M. De. 2002. *Purification and Partial Characterization of Bacillon 490, a novel Bacteriocin Produced by Thermophilic Strain of Bacillus Licheniformis*. Microb cell Fact. 1 (1): 1.
- Montville, T.J. and Chen. Y. 1998. *Mechanistic Action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved question*. App. Microbiol Biotechnol 50 (5): 511-519.
- Mustopa, Apon. 2009. *Koleksi Protokol Laboratorium Virologi Molekuler*. Pusat Penelitian Bioteknologi. LIPI. Bogor.
- Nunuk, P. 2003. *Metabolisme Bakteri*. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sumatera Utara. Pdf.
- Oscarriz, J.C. and Pisabaro. A.G. 2001. *Classification and mode of Action of membrane-active bacteriocins produced by gram positive bacteria*. Int. Microbiol. 4:13-19.
- Othman, A. A, Ismail. N.A, Ghani. I, dan Adenan. 2005. *Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Cocoa Beans*. Departement of Nutrition and Health Sciences, Faculty of Medicine and Health Science, Universiti Putra Malaysia. 43400 UPM, Serdang Selangor. Malaysia.



- Rostini, Iis. 2007. *Peranan Bakteri Asam Laktat (Lactobacillus plantarum) terhadap Masa Simpan Filet Nila Merah pada Suhu Rendah*. Tesis Master Fakultas Perikanan dan ilmu Kelautan Universitas Padjajaran. Jatinangor.
- Sumaryati. S., dan Purwati E. 8 Agustus 2006. *Peranan Pangan Probiotik untuk Mikroba Patogen dan Kesehatan*. Universitas Andalas. Padang.
- Sumaryati. S., Purwati E., Z. Hidayat. 24 -25 Januari 2005. *Lactobacillus sp. Isolasi dari Biovicophitomega sebagai Probiotik*. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jakarta.
- Sablon, E., Contreras B. and Vandamme E., 2000. *Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: Mode of Action, genetics and biosynthesis*. Adv Biochem Eng Biothenol. 68: 21-60.
- Salminen, S. dan Von W. A. 1998. *Lactic acid bacteria*. Marcel Dekker. New York.
- Sharpe, M.E. 1981. *The Genus Lactobacillus In The Procaryotes : A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria* (M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel, eds). Springer-Verlag, Berlin, pp.1653-1674.
- Suparjo. 2008. *Bakteriosin dan Perannya dalam Ekologi Mikroba Rumen*. Laboratorium Makanan Ternak Fakultas Peternakan. Universitas Jambi.
- Surono, I.S. 2004. *Probiotik: Susu Fermentasi dan Kesehatan*. PT. Tri Cipta Karya. Jakarta.
- Surono, I.S. dan Nurani, D. 2001. *Exploration of indigenous dadih lactic bacteria for probiotic and starter cultures*. Domestic Research Collaboration

Grant-URGE-IBRD World Bank Project 2000-2001. Research Report. January 2001.

Stanbury, P.F. and Whitaker. A. 1984. *Principle of Fermentation Technology*. Pergamon Pers. Oxford.

Tagg, J.R., Dajani, A.S dan Wannamaker, L.W., 1976. *Bacteriocins of Gram-positive bacteria*. Bacteriology Reviews, 40, 722-756.

Tumpal, H., Siregar, S., Slamet, R., dan Laeli, N. 2009. *Coklat; Pembudidayaan, Pengolahan, Pemasaran*. Penebar Swadaya. Jakarta.

Unus, S. *Mikrobiologi Dasar*. 2005. Papas Sinar Sinanti. Jakarta.

Whitehead, H. R, dan Lane, D. J. 1933. *The Influence of Penicillin on The Manufacture and Ripening of Cheddar Cheeses*. J. Diry Res. 23, 355-360.

Woolford, M.K., 1984. *The silage fermentation*, pp 304-306. Marcel Dekker, Inc., New York.



### Lampiran 1. Prosedur Fermentasi kakao



## Lampiran 2. Isolasi akteri asam laktat

### 1. Proses Pengkayaan (*Enrichment*)

1 gram sampel biji kakao  
hasil fermentasi

- Masukkan kedalam 9 mL MRS Broth
- Simpan dalam jar anaerob

Inkubasi selama 24 jam  
dalam incubator 37°C

### 2. Proses Pengenceran (*Serial Dillution*)

Setelah 24 jam, ambil sebanyak 0,1 mL

- Masukkan ke dalam eppendorf (tube) yang berisi 0,9 mL Pepton water ( $10^{-1}$ )

Ambil 0,1 mL dari  $10^{-1}$ , masukkan kedalam tube ke dua yang sudah berisi 0,9 mL Pepton water  $10^{-2}$ . begitu seterusnya sampai  $10^{-8}$

### 3. Proses Penanaman (*Planting*)

Ambil 0,1 mL dari tube  $10^{-8}$

- Masukkan ke dalam 15 mL MRS Agar yang telah beku dengan metoda gores

Inkubasi 2x24 jam di dalam jar anaerob  
pada inkubator suhu 37°C

Hitung koloni yang tumbuh



**Lampiran 3. Identifikasi bakteri asam laktat**

#### Lampiran 4. Uji aktivitas antimikroba

Tumbuhkan bakteri uji pada media MRS broth

- Inkubasi semalam dengan suhu 37°C

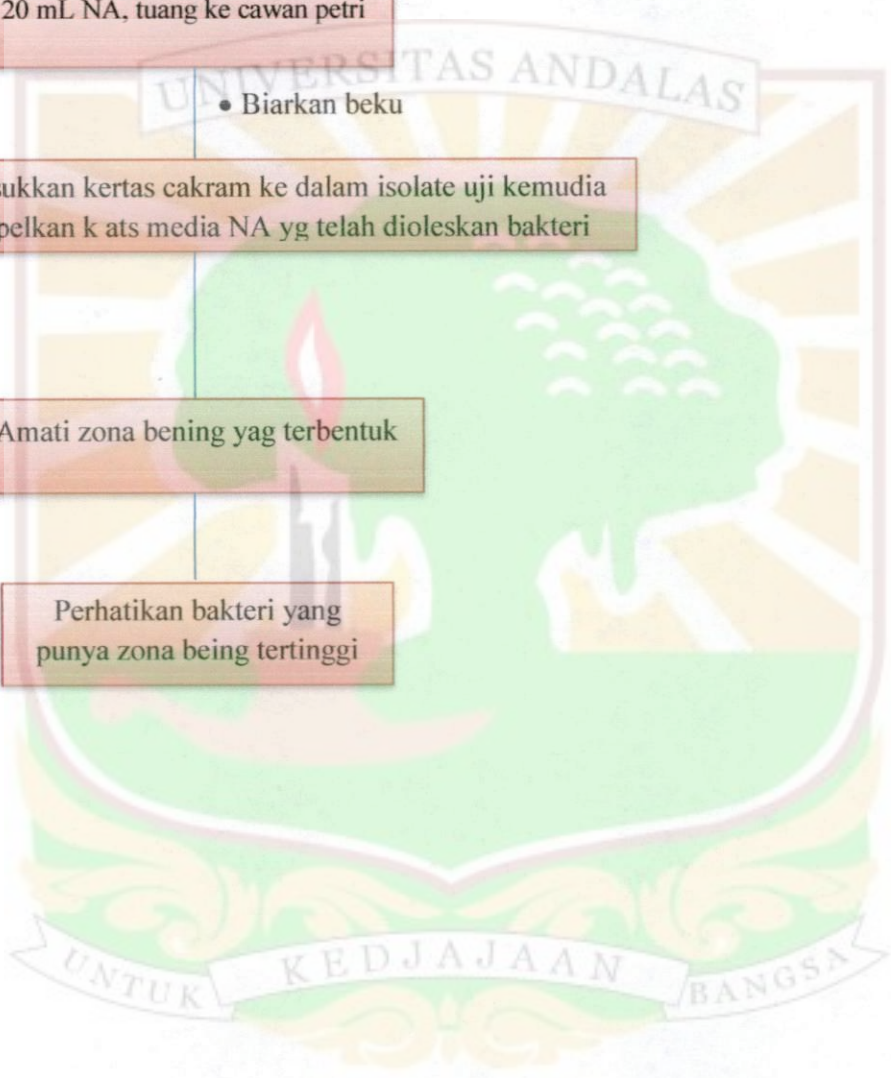
20 mL NA, tuang ke cawan petri

- Biarkan beku

Masukkan kertas cakram ke dalam isolate uji kemudian tempelkan ke atas media NA yang telah dioleskan bakteri

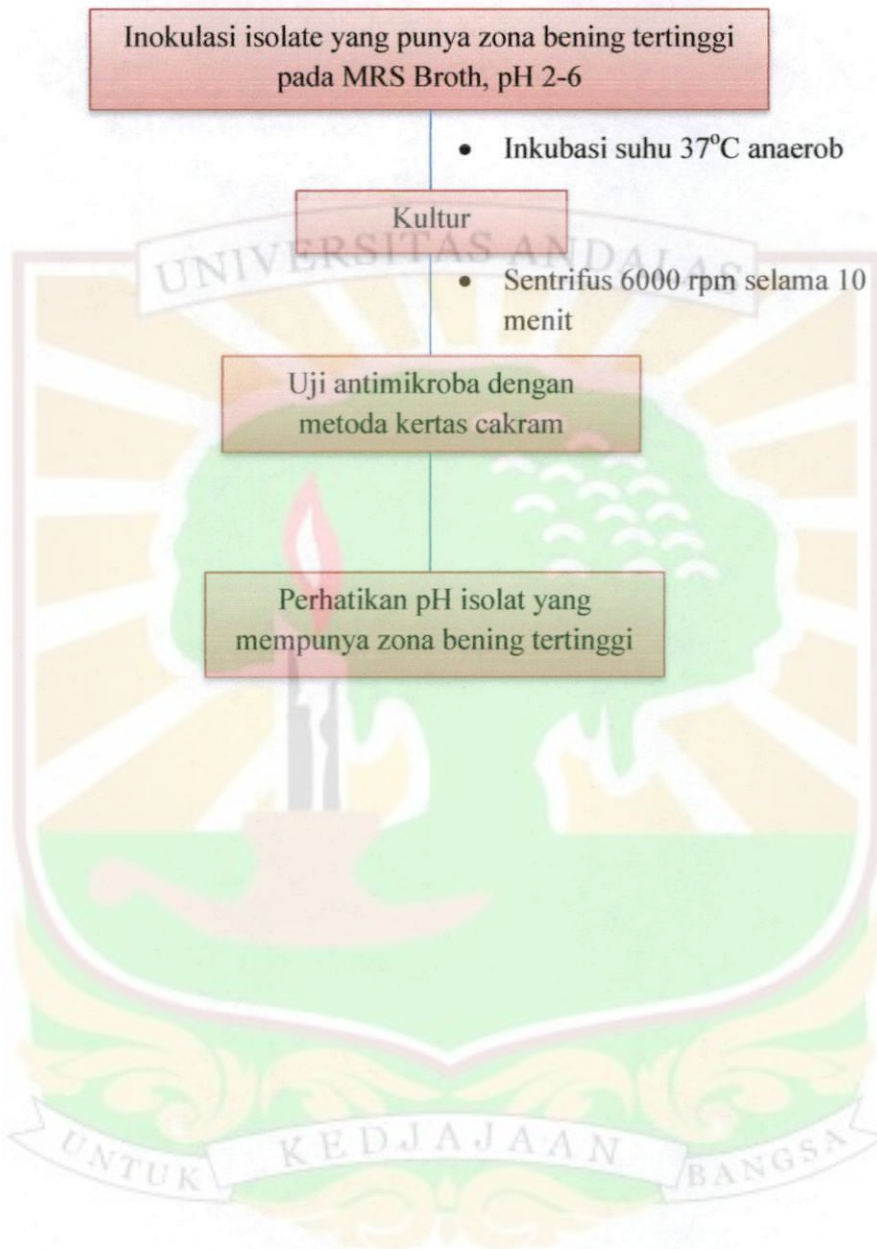
Amati zona bening yang terbentuk

Perhatikan bakteri yang punya zona bening tertinggi

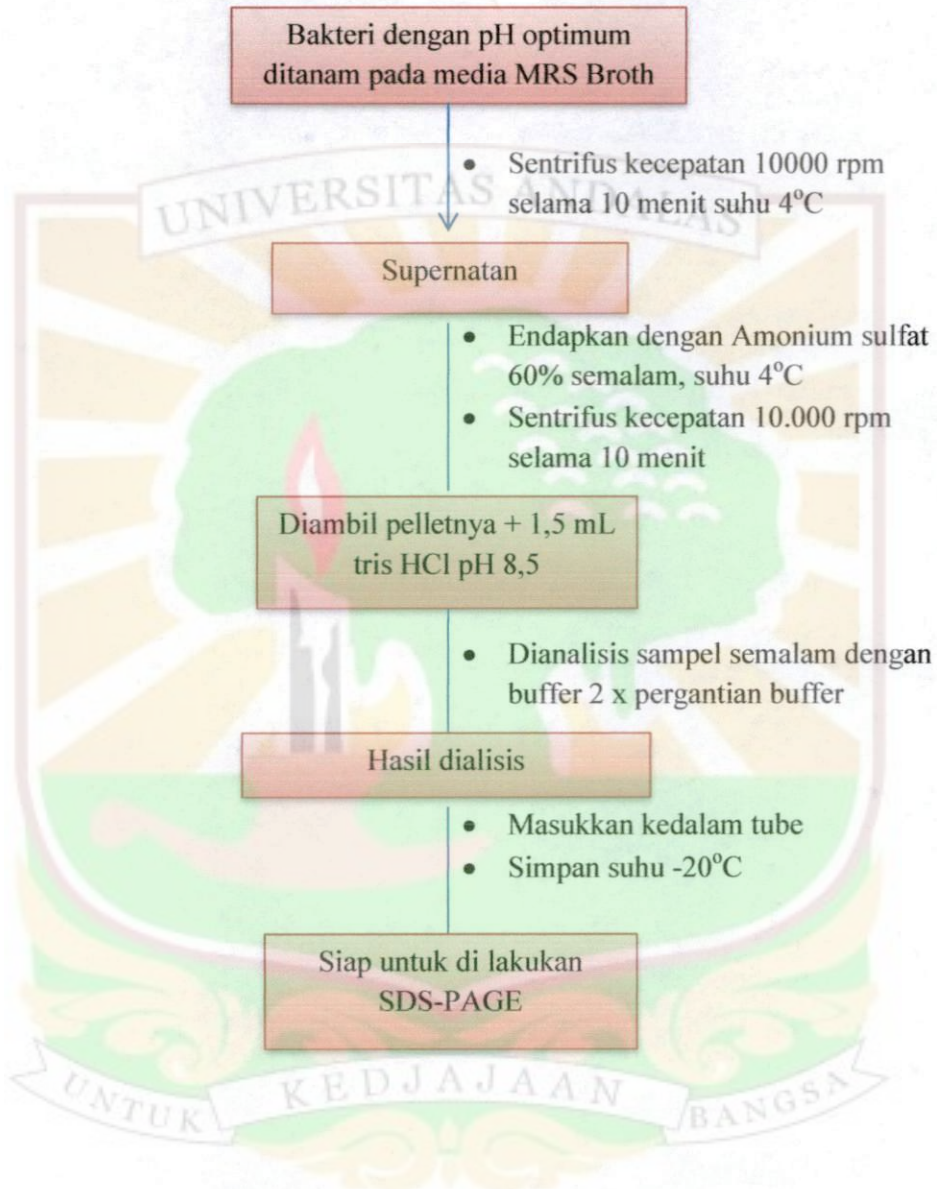




### Lampiran 5. Optimasi pembentukan bakteriosin

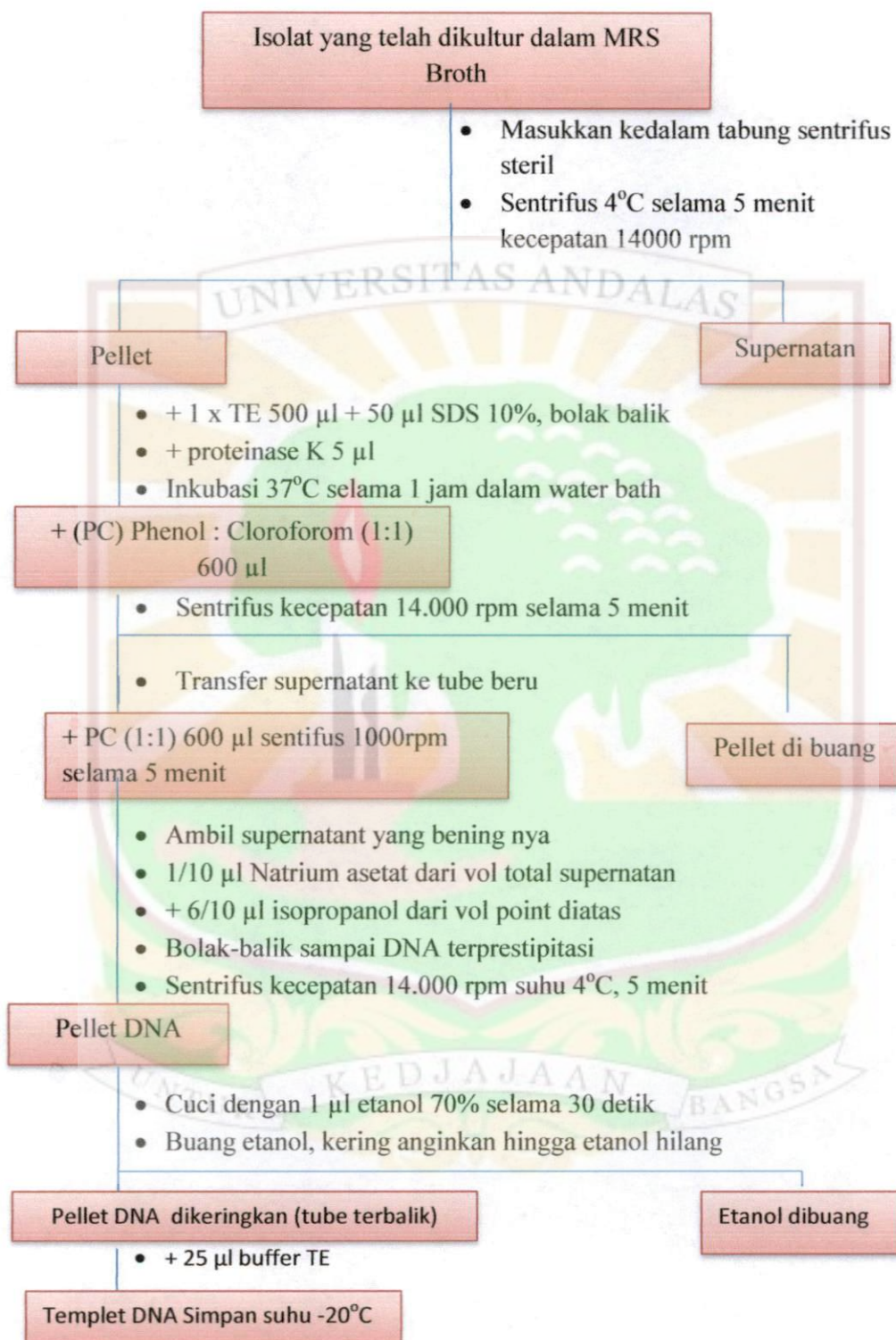


## Lampiran 6. Penentuan berat molekul bakteriosin





## Lampiran 7. Isolasi DNA



**Lampiran 8. Pengamatan morfologi bakteri**

Isolat	Ukuran	Bentuk	Elevasi	Bentuk Pinggir	Warna	Uji Gram
<b>H1</b>	Kecil	Bulat	Cembung	Bulat penuh	Putih	Kokus (gram +)
<b>H2</b>	Kecil	Teratur	Cembung	Bulat penuh	Putih	Kokus (gram +)
<b>H3</b>	Kecil	Bulat	Cembung	Bulat penuh	Putih	Kokus (gram +)
<b>H4</b>	Kecil	Teratur	Cembung	Bulat penuh	Putih	Kokus (gram +)
<b>H5</b>	Kecil	Bulat	Cembung	Bulat penuh	Putih	Kokus (gram +)
<b>H6</b>	Kecil	Teratur	Cembung	Bulat penuh	Putih	Kokus (gram +)
<b>H7</b>	Kecil	Bulat	Cembung	Bulat penuh	Putih	Kokus (gram +)
<b>H8</b>	Kecil	Teratur	Cembung	Bulat penuh	Putih	Kokus (gram +)

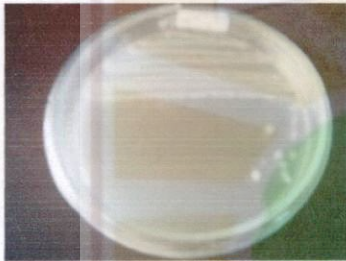


**Lampiran 9. Gambar isolat BAL**

Isolat H1



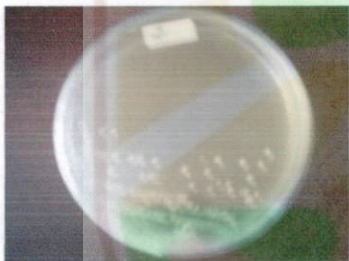
Isolat H2



Isolat H3



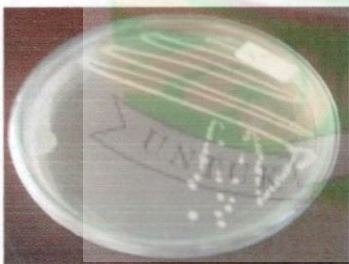
Isolat H4



Isolat H5



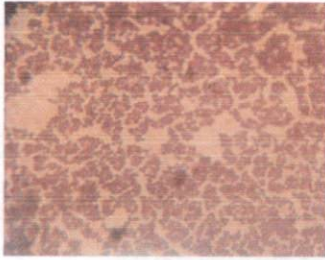
Isolat H6



Isolat H7



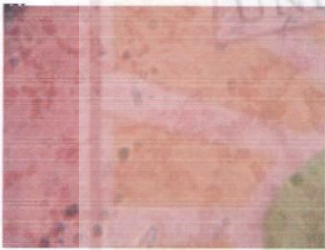
Isolat H8

**Lampiran 10. Hasil pewarnaan gram**

Isolat H1



Isolat H2



Isolat H3



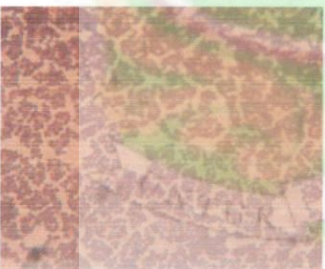
Isolat H4



Isolat H5



Isolat H6



Isolat H7



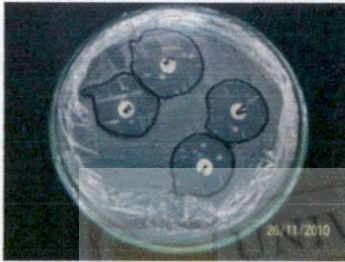
Isolat H8



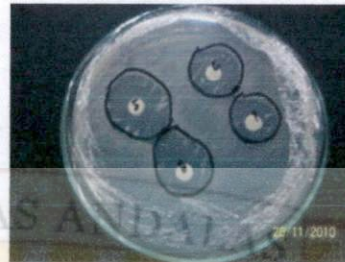
### Lampiran 11. Foto uji antimikroba

- *Staphylococcus aureus*

Isolat H1-H4

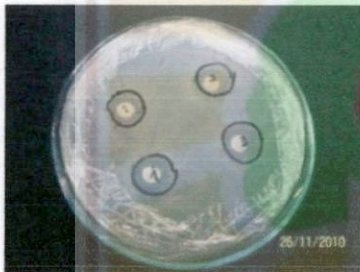


Isolat H5-H8



- *Eschericia coli*

Isolat H1-H4

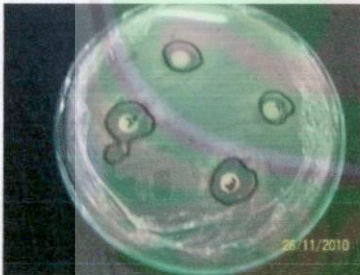


Isolat H5-H8

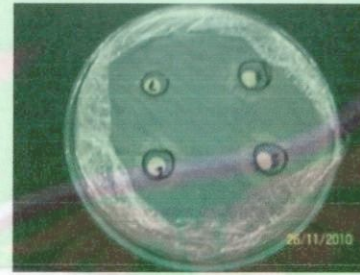


- *Streptococcus sp.*

Isolat H1-H4



Isolat H5-H8



- *Pseudomonas sp.* (Isolat H1-H8)



**Lampiran 12. Foto uji antimikroba antibiotic terhadap ke-4 bakteri patogen**

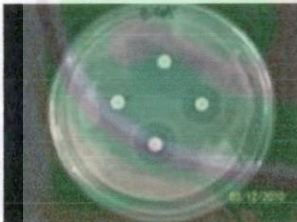
1. *Pseudomonas sp.* (Ampisilin, amoxilin, ciploflosasin, eritromisin)



2. *Staphylococcus aureus* (ampisilin, amoxilin, ciploflosasin, eritrimisin)



3. *Escherichia coli* (ampisilin, amoxilin, ciploflosasin, eritrimisin)

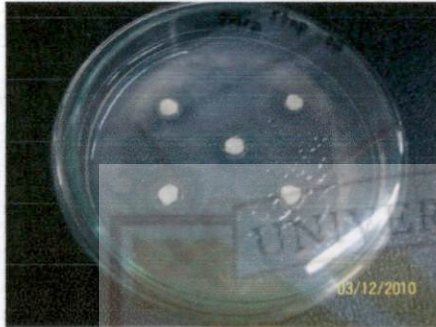


4. *Streptococcus sp.* (ampisilin, amoxilin, ciploflosasin, eritrimisin)





**Lampiran 13. Foto uji optimasi pembentukan bakteriosin terhadap bakteri *Staphylococcus aureus***



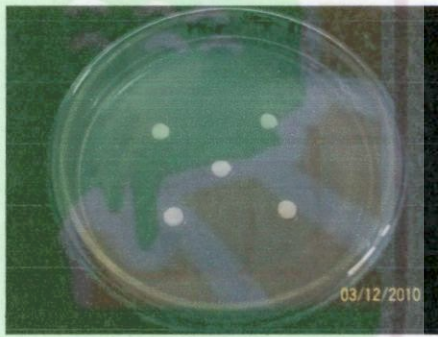
pH 2



pH 3



pH 3

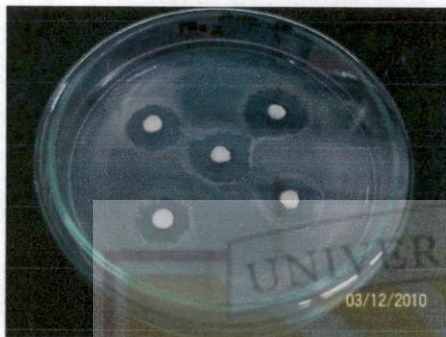


pH 4

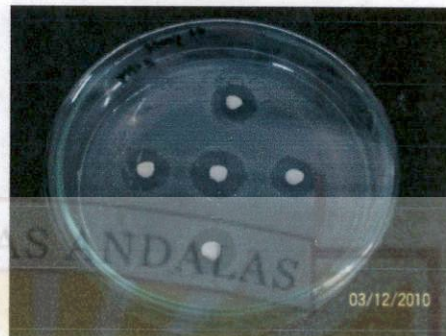


pH 6

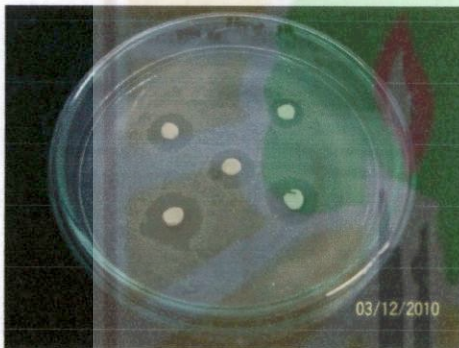
**Lampiran 14. Optimasi pembentukan bakteriosin terhadap bakteri *Streptococcus* sp.**



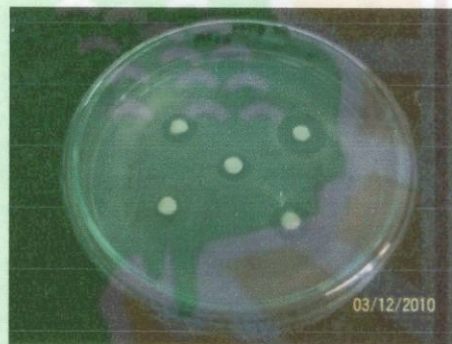
pH 2



pH 3



pH 4



pH 5



pH 6



### Lampiran 15. Uji aktivitas antimikroba

#### 1. Terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *E. coli*

Isolat	Zona Hambat (mm)					
	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherecia Coli</i>		
	24 jam	48 jam	72 jam	24 jam	48 jam	72 jam
H1	23.75	22.75	22	10.75	13	13.5
H2	23	23.5	23	10.75	14.75	13.75
H3	26	24.75	24.25	12.25	14.25	15.5
H4	27.75	27.5	28.25	19.25	18	17.5
H5	24.5	24.5	24.75	14.25	16.25	16.75
H6	20.25	21	20.5	13.75	14	14.5
H7	18.25	21	18.25	15	15.25	15.25
H8	20.5	18	21.5	14.75	14.75	14.5

#### 2. Terhadap bakteri *Streptococcus sp.* dan *Pseudomonas sp.*

Isolat	Zona Hambat (mm)					
	<i>Streptococcus sp.</i>			<i>Pseudomonas sp.</i>		
	24 jam	48 jam	72 jam	24 jam	48 jam	72 jam
H1	11.75	12	12.25	12	14	13
H2	10	11.25	10.75	14.5	12.25	12.25
H3	15.25	14.25	14	11.25	11.75	13.75
H4	16	15.75	16	11.25	13.75	14.5
H5	10.5	10.25	10.5	11	12	12
H6	10.25	10	9.75	10.75	12	12.5
H7	8.5	8.75	8.75	10.25	11.75	11.75
H8	10.75	10.25	11	11.75	11.5	13.75

## Lampiran 16. Optimasi pembentukan bakteriosin

### 1. Isolat H2

Waktu	Zona Hambat (mm)									
	<i>Staphylococcus aureus</i>					<i>Streptococcus sp.</i>				
	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6
24 Jam	17.25	17.75	19.5	16.5	18.5	20	20	22.5	18.75	21
48 Jam	18	17.75	19.25	16.25	19	20	19.75	22.75	18	21
72 Jam	17.5	17	19.25	16	18.75	20	19.75	22.5	17.75	20.5

### 2. Isolat H3

Waktu	Zona Hambat (mm)									
	<i>Staphylococcus aureus</i>					<i>Streptococcus sp.</i>				
	PH 2	pH 3	pH	pH 5	pH 6	pH 2	pH3	pH 4	pH 5	pH 6
24 jam	20.5	22	20	18.75	21	20.25	20.5	23.25	18.5	20.75
48 jam	22.75	20.25	20	18	21	13.75	12.75	18.75	11	14
72 jam	22.5	20.2	20	17.75	20.5	13.5	12.5	18.5	10.5	13.75



### 3. Isolat H4

Waktu	<i>Staphylococcus aureus</i>					<i>Streptococcus sp.</i>				
	PH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 2	pH3	pH 4	pH 5	pH 6
24 jam	19.75	20.75	22.75	22.5	19.25	19.75	20.75	22	20.5	19.75
48 jam	20.5	19.5	21.25	19.75	20	13.75	13.25	17.25	8.75	16.75
72 jam	20	19	21	19.25	19.75	13.75	13	17.5	8.75	16.5

### 4. Data zona hambat antibiotik terhadap bakteri patogen

Waktu	Zona Hambat (mm)							
	<i>Escherichia coli</i>				<i>Pseudomonas sp</i>			
	AMP	AML	CIP	ERIT	AMP	AML	CIP	ERIT
3 Jam	0	0	0	0	0	0	0	0
24 Jam	20.5	21.5	37.25	0	20.25	19.25	11	11.5
48 Jam	9.5	12.75	10	0	20.5	19	10.25	8.25
72 Jam	9	12.75	10	0	20.23	18.05	8.5	7

Waktu	Zona Hambat (mm)							
	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Streptococcus sp</i>			
	AMP	AML	CIP	ERIT	AMP	AML	CIP	ERIT
3 Jam	0	0	0	0	0	0	0	0
24 Jam	20	33.75	21.25	26	13.75	12.75	30	38.5
48 Jam	15	29.75	16	16	13	12.75	31	9
72 Jam	9	28.25	10.5	12.4	13	12	31	7

**Lampiran 17. Urutan basa-basa nitrogen sampel isolat H4**

>Hasil sekuen isolate H4-509 bp-27F

ATATAATGCAGTCGACGAACCTCCGGGATTGATTATGACGTGCTTCCACTGAATGCGATTTTAAC  
ACGAAGTTAGGGGCGAACGGATGAGTAACTCGTGCTTAACCTGCCAGAATCAGGGGATAACA  
CCTTATTGCACATGCTAGTACCGTATAACAGAGAAAACCGCCTGGTTTTCTTTAAAAGATGGAT  
CTGCTCGCACTTCTGTTTGGACCCGCATCGCATTAGCTTGTTACAGAGGCTATCATTTAAAGGC  
GATGATGCGACTTCGACCTGAGACCAAATCGGCCAGTTGGGACTGAGCCATGATCAAACCTCTCT  
CGGGAGGCGGCAGTAGGGATCTTCACATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG  
TGAAGAAGGATTCGGCTCGTACAGATCTGTTGTTAGTGAAGAACGTGGGGGAGAGTAACTGT  
TCGCCAGTGACGGTATTTAACCTTAAAGAAAGGATAACTGCATTGT





## Lampiran 18. Hasil blast



Hasil analisis BLAST isolat H4

**Lampiran 19.** Hasil alignment isolate H4 dengan *Pediococcus acidilactici* GL 20

Query	2	TATA-ATGC-AGTCG-ACGAACCTCCG-GGATTGATTATGACGTGCTTCCACTGAATGCG	57
Sbjct	2	TATACATGCAAGTCGAACGAACCTCCGTTAATTGATTATGACGTGCTTGCACGTGAATGAG	61
Query	58	ATTTTAACACGAAGTTAGGGGCGAACGGATGAGTAACCTGCTTAACCTGCCAGAAATC	117
Sbjct	62	ATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCAGAAAGC	121
Query	118	AGGGGATAACACCT-TATTGCACATGCTAGTACCGTATAACAGAGAAAACCGCCTGGTTT	176
Sbjct	122	AGGGGATAACACCTGGA-AACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCCTGGTTT	180
Query	177	TCCTTTAAAGATGGATGCTGCTGCACTTCTGTTTGGACCCGCACTGGCAITAGCTTGTC	236
Sbjct	181	TCCTTTAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGCAITAGCTAGTTG	240
Query	237	ACGAGGCTATCATTTAA--AAGGCGATGATGCG-A-CITCGACCTGAGACCA-AATCGGC	291
Sbjct	241	GTGAGG-TAACGGCTCACCAAGGCGATGATGCGTAGC--CGACCTGAGAGGGTAATCGGC	297
Query	292	CAG-TTGGGACTGAGCCATGATCAA-ACTCTCT-CGGGAGGCGGCACTAGGGA-TCCTTCC	347
Sbjct	298	CACATTGGGACTGAGACACGGCCGAGACTC-CTACGGGAGGCAGCACTAGGGAATCTTCC	356
Query	348	ACA-TGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGATTTGGGCTCGTA	406
Sbjct	357	ACARTGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGATTTGGGCTCGTA	416
Query	407	CAGATCTGTTGTAGTGAAGAACGTGGGGGAGAGTAAGTGTTCGCCAGTGACGATATTT	466
Sbjct	417	AAGCTCTGTTGTAAAGAAGAACGTGGGTGAGAGTAAGTGTTCACCCAGTGACGATATTT	476
Query	467	AAAC	470
Sbjct	477	AAAC	480

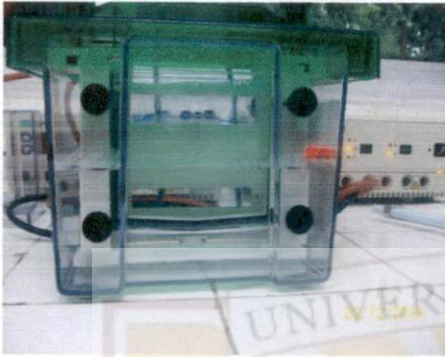
Keterangan :

Sbjct ; sekuen isolat H4

Query ; sekuen data GenBank



## Lampiran 20. Peralatan penelitian



SDS-PAGE



Running SDS-PAGE



Pipet mikro



Sekuenser



Sentrifus dingin



koloni *counter*